

*Entwicklung von rekombinanten
Antikörpern gegen das aviäre
Enzephalomyelitis Virus*

Von der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Gottfried Wilhelm Leibniz Universität Hannover
zur Erlangung des Grades einer
DOKTORIN DER NATURWISSENSCHAFTEN

Dr. rer. nat.
genehmigte Dissertation

von
M.Sc. Maren Wichmann
geboren am 03.09.1980 in Hannover

2010

Referent: Prof. Dr. H.-J. Jacobsen

Korreferent: Prof. Dr. E. Maiß

Tag der Promotion: 10.03.2010

Zusammenfassung

Bei der aviären Enzephalomyelitis handelt es sich um eine weltweit verbreitete virale Infektionskrankheit von Geflügel. Krankheitserscheinungen treten vornehmlich in jungen Küken auf und äußern sich in Müdigkeit, Teilnahmslosigkeit, Ataxie bis hin zur partiellen oder totalen Parese von Beinen und Flügeln. Dies führt zum Verhungern und Verdursten der Küken. Ältere Tiere zeigen einen Rückgang der Legeleistung und Schlupfrate sowie eine erhöhte Embryonensterblichkeit. Die aviäre Enzephalomyelitis stellte bis zur Einführung einer intensiven Impfpraxis einen bedeutenden wirtschaftlichen Faktor dar. Erste Vakzinierungen wurden in den 50er Jahren mit Gehirnhomogenaten infizierter junger Küken durchgeführt. Heute erfolgt die Vakzinierung mit kommerziell erhältlichen Impfstoffen, die den Stamm Calnek 1143 enthalten. Der Impfstofftitert für die Freigabe des batches wird zur Zeit nach Vorschrift des Europäischen Arzneibuches, European Pharmacopoeia, durch *in-vivo*-Titration im embryonierten pathogenfreien Hühnerei mit anschließendem Schlupf und 7-10-tägiger Beobachtung der Küken bestimmt. Für die Entwicklung eines standardisierten und validierten *in-vitro*-Verfahrens zur quantitativen Virusbestimmung auf Basis eines enzymgekoppelten Immunadsorptionstests („enzyme-linked immunosorbent assay“, ELISA), ist die Entwicklung eines Antikörpers gegen das aviäre Enzephalomyelitis Virus (AEV) nötig. Im Rahmen dieser Arbeit konnte erfolgreich ein „single chain“ Antikörper (scFv) mittels der Methode des „Phage Display“ gegen das AE Virus isoliert werden. Dieser Antikörper weist eine Affinität zum AEV mit einer Dissoziationskonstante von 5,27 μM auf. Die Isolierung des Antikörpers erfolgte aus einer semisynthetischen humanen Phagenbibliothek (ETH-2). Als Antigen im Panningverfahren wurde alternativ zu den kompletten Viruspartikeln das rekombinant exprimierte Hüllprotein VP2 des AEV eingesetzt. Für die Produktion des rekombinanten Antikörpers in einem geeigneten Expressionssystem erfolgte sowohl eine stabile Transformation in *Nicotiana tabacum* als auch eine transiente in *Nicotiana benthamiana*. Der transient exprimierte Antikörper konnte aus der Pflanze isoliert und immunologisch nachgewiesen werden.

Schlagwörter: Aviäres Enzephalomyelitis Virus, scFv, Phage Display, Panning

Abstract

Avian encephalomyelitis is a worldwide spread infectious viral disease affecting poultry. Symptoms are mainly found in young chickens as ataxia, tremors of the head and neck, and partial or total paralysis of wings and legs leading to death due to starvation and thirst. In older chickens it is characterized by reduced egg production, hatchability, and an increased death rate of embryos. Therefore, avian encephalomyelitis was an important economic factor until widespread use of vaccines. Vaccination started in the 1950s with crude suspensions of young chicks macerated brains. Today, vaccination is done by using commercially available vaccines containing the non-embryo-adapted strain Calnek 1143. For vaccine-batch release testing, the amount of antigen per dose is quantified by a titration method using embryonated specified pathogen free eggs and subsequential determination of mortality of hatched chicks for seven to ten days according to the European Pharmacopoeia. The development of specific antibodies against the virus are pivotal to the development of a standardised and validated *in-vitro*-method for quantitative estimation of antigen based on enzyme-linked immunoabsorbent assay (ELISA).

During this work, an AE virus-specific single-chain antibody (scFv) was successfully isolated by using phage display technology. This antibody shows an affinity to AEV with a dissociation constant of 5,27 μ M. Isolation was done from a semisynthetic human phage library (ETH-2). The recombinant expressed VP2 protein, a structural protein of the virus, was used in panning procedure as antigen alternatively to the full virus particles. The production of the recombinant antibody in a suitable production system was done with a stable transformation in *Nicotiana tabacum* as well as a transient in *Nicotiana benthamiana*. The transiently expressed antibody was isolated from the plant and immunologically proved.

Keywords: avian encephalomyelitis virus, scfv, Phage Display, Panning

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung.....	1
2 Material und Methoden.....	12
2.1 Materialien.....	12
2.1.1 Chemikalien.....	12
2.1.2 Oligonukleotide.....	12
2.1.3 Molekulargewichtsstandards.....	14
2.1.3.1 DNA-Standard.....	14
2.1.3.2. Proteinstandard.....	14
2.1.4 Medien zur Anzucht und Selektion von Bakterien.....	14
2.1.5 Medien zur Anzucht und Selektion von <i>Nicotiana tabacum</i>	16
2.1.6 Verwendete Stammlösungen.....	18
2.1.7 Verwendete Puffer.....	19
2.1.8 Antikörper.....	20
2.1.9 Restriktionsenzyme.....	20
2.1.10 Bakterienstämme.....	21
2.1.11 Verwendete Vektoren.....	21
2.1.12 ETH-2 humane Antikörper-Phagenbank.....	23
2.1.13 Verwendete Geräte.....	24
2.2 Methoden.....	26
2.2.1 Anzucht von Bakterienkulturen.....	26
2.2.1.1 Anzucht von <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>).....	26
2.2.1.2 Anzucht von <i>Agrobacterium tumefaciens</i> (<i>A. tumefaciens</i>).....	26
2.2.2 Überexpression von scFv-Antikörpern in Bakterien.....	26
2.2.3 Überexpression von VP2 in Bakterien.....	27
2.2.4 Anlage von „Glycerinstammkulturen“.....	27
2.2.5 Photometrische Bestimmung der optischen Dichte (OD) von Bakterienkulturen.....	27
2.2.6 Plasmidisolation aus <i>E.coli</i>	27
2.2.7 Quantifizierung von Nukleinsäure-Lösungen.....	28
2.2.8 Sequenzierungen.....	28
2.2.9 Herstellung Hitzeschock-kompetenter Bakterien (<i>E.coli</i>).....	28
2.2.10 Transformation von <i>E. coli</i> mittels Hitzeschock.....	28
2.2.11 Herstellung elektrokompetenter Bakterien (<i>A. tumefaciens</i>).....	28

2.2.12 Transformation von <i>A. tumefaciens</i> mittels Elektroporation.....	29
2.2.13 Transiente Transformation von <i>N. benthamiana</i>	29
2.2.14 Stabile Transformation von <i>N. tabacum</i>	29
2.2.15 DNA-Isolation aus <i>N. tabacum</i>	30
2.2.16 RNA-Isolation aus <i>N. tabacum</i>	30
2.2.17 Proteinextraktion aus <i>N. tabacum</i>	31
2.2.18 Proteinextraktion aus <i>N. benthamiana</i>	31
2.2.19 Trichloressigsäurefällung	32
2.2.20 Restriktionsverdau.....	32
2.2.21 Dephosphorylierung.....	33
2.2.22 Ligation.....	33
2.2.23 Reverse Transkription.....	33
2.2.24 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	34
2.2.25 Kolonie-PCR.....	35
2.2.26 Multiplex PCR.....	35
2.2.27 Multiplex-RT PCR.....	36
2.2.28 Agarose-Gelelektrophorese.....	37
2.2.29 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	37
2.2.30 Western-Blot.....	38
2.2.31 Proteinfärbungen.....	38
2.2.31.1 Ponceau-Färbung	38
2.2.31.2 Silberfärbung.....	38
2.2.31.3 Coomassiefärbung	39
2.2.31.4 Immunfärbung.....	39
2.2.32 Elektroelution.....	39
2.2.33 Aufreinigung von Antikörpern über Protein A-Affinitätschromatographi.....	40
2.2.34 Aufreinigung von Antikörpern über Histidin-tag-Affinitätschromatographie...40	
2.2.35 Umpuffern von Antikörperfragmenten.....	41
2.2.36 Dialyse.....	41
2.2.37 Konzentrationsbestimmung von Antikörperfragmenten.....	41
2.2.38 Aufreinigung von rekombinantem VP2-Protein.....	41
2.2.39 Produktion von löslichen scFvs in Mikrotiterplatten.....	42
2.2.40 ELISA.....	42
2.2.41 Anzucht von <i>E. coli</i> XL-1 blue für die Infektion mit Phagen.....	43

2.2.42 Phageninfektionen.....	43
2.2.43 Fällung der amplifizierten Phagen mit Polyethylenglykol.....	44
2.2.44 Panning gegen VP2.....	44
2.2.45 Panning gegen AEV.....	45
2.2.46 Titerbestimmung.....	46
2.2.47 Amplifizierung der scFv-Phagen.....	46
2.2.48 Desoxycholat-Screening (DOC).....	46
2.2.49 Bindungsanalysen von Antikörperfragmenten.....	47
2.2.49.1 Kopplung des Sensorchips.....	48
2.2.49.2 Affinitätsmessungen von Antikörperfragmenten.....	49
2.2.50 Computergestützte Datenauswertung.....	49
2.2.50.1 DNA-Sequenzen.....	49
2.2.50.2 SPR-Daten.....	50
3 Ergebnisse.....	51
3.1 Klonierung des rekombinanten Virushüllproteins VP2.....	51
3.2 Expression und Aufreinigung des rekombinanten Virushüllproteins VP2.....	53
3.3 Selektion auf Antigen-spezifische scFv-Phagen gegen VP2 (Panning).....	56
3.4 Selektion auf Antigen-spezifische scFv-Phagen gegen AEV (Panning).....	57
3.5 Analysen der selektierten scFv-Phagen.....	59
3.5.1 Analysen der selektierten scFv-Phagen mittels PCR.....	59
3.5.2 Expressionsanalysen der selektierten scFv-Klone.....	60
3.5.3 Sequenzanalysen selektierter scFv-Klone.....	61
3.5.4 Dot-Blot Analysen von scFv AEV5	61
3.5.5 Immunfärbung mit scFv AEV5.....	62
3.5.6 ELISA mit gegen VP2 selektierten scFv-Klonen.....	63
3.6 Aufreinigung der scFvs.....	64
3.7 Immunfärbung mit scFv VP2 20.....	68
3.8 ELISA mit scFv VP2 20.....	69
3.9 Charakterisierung der scFvs mittels Oberflächenplasmonresonanz.....	70
3.9.1 Kopplung der Viruspartikel.....	70
3.9.2 Affinitätsbestimmung ausgewählter scFvs.....	71
3.9.2.1 Affinitätsbestimmung von scFv VP2 20.....	72
3.9.2.2 Affinitätsbestimmung von scFv VP2 21, 25, 26 und 28.....	72
3.10 Konstruktion des binären Vektors pcIPG+35S.....	73

3.11 Stabile Transformation von <i>N. tabacum</i>	74
3.11.1 Analysen von <i>N. tabacum</i> mittels Multiplex-PCR.....	75
3.11.2 Expressionsanalysen von <i>N. tabacum</i> auf Transkriptionsebene.....	77
3.12 Transiente Transformation von <i>N. benthamiana</i>	79
4 Diskussion.....	81
5 Zusammenfassung und Ausblick.....	94
6 Literaturverzeichnis.....	95
7 Anhang.....	106

Abkürzungsverzeichnis

α	anti
Abb.	Abbildung
AE	Aviäre Enzephalomyelitis
AEV	Aviäres Enzephalomyelitis Virus
Amp	Ampicillin
AP	Alkaline Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
cfu	Kolonieformende Einheiten
CDR	„complementary determining region“
C _H	Konstante Region der schweren Kette
C _L	Konstante Region der leichten Kette
C-terminal	Carboxylgruppen-terminal
Da	Dalton
DEA	Diethanolamin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	desoxy-Nukleotidtriphosphat
DTT	Dithiotreitol
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
ELISA	„enzyme-linked immunosorbent assay“ enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
EtBr	Ethidiumbromid
F'	Fertilitäts-Plasmid
Fab	„fragment antigen binding“
Fc	„fragment crystallizable“
Fv	„fragment variable“
g	Gramm
h	Stunde
Hsp	Heatshock Protein

Ig	Immunglobulin
IPTG	Isopropyl- β -D-Thiogalactopyranosid
k	kilo
k_a	Assoziationsrate
K_D	Dissoziationskonstante
k_d	Dissoziationsrate
Kan	Kanamycin
Kb	Kilobase
k_D	Dissoziationskonstante
kV	kilo Volt
m°	Milligrad
M13	Bakteriophage
MES	N-Morpholinoethan Sulfonsäure
min	Minute
MM	Minimalmedium
mRNA	„messenger RNA“, Boten-RNA
MS	Massenspektrometrie
NBT	Nitro-Blau-Tetrazoliumchlorid
NHS	N-Hydroxysuccinimide
N-terminal	Aminogruppen-terminal
OD	Optische Dichte
ORF	„open reading frame“, offener Leserahmen
Ori	“Origin of replikation”; Replikationsursprung
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	„phosphate buffered saline“; Phosphat-gepufferte physiologische Kochsalzlösung
PBST	PBS + 0.05% Tween 20
PCR	„polymerase chain reaction“; Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
pel B	Pektatlyase B
Phage	Bakteriophage
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RNA	Ribonucleinsäure
RNase	Ribonuklease

RT	reverse Transkription
RU	„resonance units“; Resonanzeinheiten
scFv	„single chain variable Fragment“, variables Einzelkettenfragment
SDS	„sodium dodecyl sulfate“, Natriumdodecylsulfat
SOB	„super optimal broth“, super optimales Nährmedium
SOC	„super optimal broth with catabolite repression“, super optimales Nährmedium mit Katabolitrepession
SSB	“SDS sample buffer”, Probenpuffer für SDS-PAGE
SPR	„surface plasmon resonance“; Oberflächenplasmonresonanz
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
Tet	Tetracyclin
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
TY	„tryptone-yeast“; Trypton-Hefe
TYE	„tryptone-yeast extract“, Trypton-Hefeextrakt
ÜNK	Übernachtkultur
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett
V _H	Variable Domäne der schweren Kette
V _L	Variable Domäne der leichten Kette
v/v	“volume/volume”; Volumenanteile/Volumen
w/v	“weight/volume”; Gewichtsanteile/Volumen

1 Einleitung

Aviäre Enzephalomyelitis

Bei der aviären Enzephalomyelitis handelt es sich um eine weltweit verbreitete Infektionskrankheit, die hauptsächlich bei Hühnern auftritt und durch das aviäre Enzephalomyelitis Virus (AEV) ausgelöst wird.

Im Jahr 1930 beschrieb Elisabeth Jones den Ausbruch einer Hühnerkrankheit in Massachusetts (USA), welche zu neurotroper Dysfunktion bei Hühnerküken führte (Jones, 1932). Sie bezeichnete die Krankheit als „encephalomyelitis in the chicken“. Aufgrund des ungewöhnlichen Tremors des Kopfes und Nackens der Küken fügte Jones 1934 die Bezeichnung „epidemic tremor“ (epidemischer Tremor) hinzu (Jones, 1934). 1938 schlug die Arbeitsgruppe um van Roekel aufgrund der Infektiösität der Krankheit und der Beschränkung der spezifischen Krankheitserscheinungen auf das Zentralnervensystem den Namen „infectious avian encephalomyelitis“ (infektiöse aviäre Enzephalomyelitis) vor, welcher zu „avian encephalomyelitis“ (aviäre Enzephalomyelitis) abgekürzt wurde (van Roekel *et al.*, 1938).

Zunächst beschränkten sich die Ausbrüche der Krankheit auf den Norden der USA, bis 1950 erfolgten sporadische Ausbrüche der Krankheit in den gesamten USA (Mathey, 1955; Taylor und Schelling, 1960). Im darauf folgenden Jahrzehnt wurden Ausbrüche sowohl in Europa, Kanada und Japan als auch in Australien registriert (Hoekstra 1964; Albiston 1966). Heutzutage ist die Krankheit weltweit verbreitet.

Durch natürliche Ausbrüche der Krankheit bzw. den Nachweis von Antikörpern gegen das AEV in Truthähnen, Wachteln, Fasanen, Puten und Rebhühnern konnte die Existenz des Virus in anderen aviären Spezies nachgewiesen werden (Hill und Raymond, 1962; Hohlstein *et al.*, 1970; Kaleta *et al.*, 1974; Mathey, 1955).

Krankheitserscheinungen treten vornehmlich bei ein bis zwei Wochen alten Küken auf (van Roekel *et al.*, 1938). Die Krankheit äußert sich zunächst in Müdigkeit und Teilnahmslosigkeit gefolgt von Ataxie. Mit dem weiteren Fortschreiten der Krankheit kommt es zu partieller oder totaler Parese der Beine und Flügel. Die daraus resultierende Bewegungsunfähigkeit führt häufig zum Verhungern oder Verdurstenden der Küken (Calnek und P J Taylor 1960; Eisengarten 1992; EE Jones 1932; Jungherr und Minard 1942). Die Infektion älterer Tiere verläuft normalerweise subklinisch und führt zu einem Rückgang der Legeleistung und Schlupfrate

sowie zu erhöhter Embryonensterblichkeit (Tannock und Shafren, 1994; Taylor *et al.*, 1955). Die horizontale Übertragung des Virus erfolgt über die fäkal-orale Infektionsroute (Calnek und P J Taylor 1960) Die Ausprägung der Symptome empfänglicher Küken ist abhängig vom Alter des Kükens zum Zeitpunkt der Infektion. Bei der vertikalen Infektion erfolgt die Übertragung von der Henne auf das Brutei. Hierbei beträgt die Inkubationszeit ein bis sieben Tage (Calnek 2003)

Die altersbedingte Resistenz der Tiere gegenüber dem AEV wird hervorgerufen durch die Produktion von neutralisierenden Antikörpern gegen das Virus, zu der erst ältere Hühner in der Lage sind (Cheville 1970; Ikeda, Matsuda und Yonaiyama 1976; Westbury und Sinkovic 1978). Erste Versuche der Vakzinierung erfolgten bereits in den 50er Jahren mit Gehirnhomogenaten infizierter junger Küken (Schaaf und Lamoreux, 1955). Heutzutage werden kommerzielle Geflügelbestände durch eine intensive Impfpraxis vor Feldinfektionen geschützt. Es werden mehrere Stämme des aviären Enzephalomyelitis Virus unterschieden, die in ihrer Virulenz variieren. Feldisolate sowie der Stamm Calnek 1143, welcher als Impfstamm dient, sind enterotrop, d.h. mit einer besonderen Neigung zum Befall des Darmtrakts und nicht embryo-adaptiert. Bei diesen Stämmen erfolgt eine orale Infektion über das mit dem Kot ausgeschiedene Virus (fäkal-orale Infektionsroute). Durch multiple Passagen von Feldisolaten in antikörperfreien Hühnerembryonen entstanden embryoadaptierte Stämme, wie der van Roekel-Stamm. Diese haben ihre enterotropen Eigenschaften verloren, sind aber stark neurotrop, was bedeutet, dass sie auf einzelne oder mehrere Nerven einwirken. Eine orale Infektion mit embryoadaptierten Stämmen kann nur mittels sehr hoher Dosen erfolgen (Calnek 2003; van Roekel, Bullis, und Clarke 1938). Zur Vakzinierung der Elterntiere wird der nicht-embryoadaptierte vollvirulente AEV-Stamm Calnek 1143 verwendet. Dadurch kommt es zu einer Übertragung der neutralisierenden maternalen Antikörper auf das Küken. Die Verabreichung der in Deutschland zugelassenen AEV-Lebendimpfstoffe TAD® AE vac (Lohmann Animal Health, LAH) und Nobilis® 1143 (Intervet) erfolgt über das Trinkwasser mit einer Minstdosis von 10^3 EID₅₀ pro Tier. Sowohl nach natürlicher als auch nach experimenteller Infektion entwickelt sich eine humorale Immunität, die langandauernd ist und zumeist lebenslang anhält (Calnek 2003)

Der Impfstofftiter wird zur Zeit nach Vorschrift des Europäischen Arzneibuches, European Pharmacopoeia, durch *in-vivo*-Titration im embryonierten Hühnerei mit anschließendem Schlupf und 7-10-tägiger Beobachtung der Küken bestimmt. Ein standardisiertes und validiertes *in-vitro* Verfahren zur quantitativen Virusbestimmung ist zur Zeit nicht verfügbar.

Aviäres Enzephalomyelitis Virus (AEV)

Der Erreger der aviären Enzephalomyelitis, das aviäre Enzephalomyelitis Virus, wird zur Zeit zum Genus Hepatoviren der Familie Picornaviridae zugeordnet (International Committee on Taxonomy of Viruses, 2002). Diese Familie enthält eine Vielzahl an Human- und Tierpathogenen, wie das Poliovirus, das Hepatitis A Virus, das Maul- und Klauenseuchevirus sowie das Rhinovirus. Es handelt sich um kleine RNA-Viren, was durch die Bezeichnung „Picorna“ widergespiegelt wird. „Picorna“ ist ein Akronym aus *pico* (pico = gr., sehr klein) und RNA, der Abkürzung für das in den Picornaviren vorhandene Erbmaterial. Den indirekten Beweis dafür, dass das Virusgenom aus RNA besteht, lieferten Shafren und Tannock, die zeigten, dass die Vermehrung des Virus in Hühnerembryogehirnkulturen nicht von der Zugabe von 5-brom-2'-deoxyuridin, einem Nukleosidanalogon, beeinflusst wird (Shafren und Tannock, 1992). Untersuchungen des Virus zeigten keine Beeinflussung der Infektiösität durch Chloroform, niedrige pH-Werte, Pepsin, Trypsin oder Desoxyribonuklease. Hohe pH-Werte, sowie die Inkubation mit Ribonuklease führen zu einer Erniedrigung des Virustiters (Butterfield *et al.*, 1969; Gosting *et al.*, 1980). Der Durchmesser der Viruspartikel beträgt 26 nm. Elektronenmikroskopische Aufnahmen ergaben das Fehlen einer Lipidhülle sowie die ikosaedrische Symmetrie des Virus (Gosting *et al.*, 1980; Tannock und Shafren 1985; Krauss und Uebers 1966). Das Kapsid des Virus besteht aus 60 Protomeren, von denen jedes aus je einer Kopie der vier viruskodierten Strukturproteine VP4 (1A), VP2 (1B), VP3 (1C) und VP1 (1D) (VP = Virusprotein) besteht. Diese bilden ein geschlossenes Kapsid, welches die (+)-Strang RNA mit dem kovalent gebundenen 5' terminalen Protein VPg („virus protein genome linked“) umschließt. VP4 ist ausschließlich im Inneren der Proteinhülle lokalisiert, VP1, VP2 und VP3 befinden sich an der Oberfläche (Abbildung 1.1).

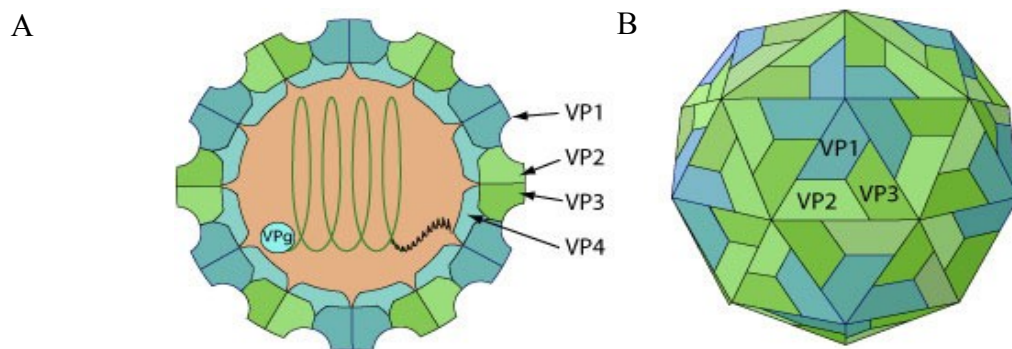


Abbildung 1.1: Struktur des aviären Enzephalomyelitis Virus.

A) Querschnitt durch das Kapsid. Dargestellt ist die mit dem 5'-terminalen Protein Vpg kovalent verbundene RNA sowie die kapsidbildenden Strukturproteine VP1, VP2, VP3 und VP4.

B) Kapsidoberfläche. Dargestellt ist die aus 60 Protomeren aufgebaute Kapsidoberfläche des Virus, die von den Strukturproteinen VP1, VP2 und VP3 gebildet wird.

Quelle: http://expasy.org/viralzone/all_by_protein/33.html (10.8.2009)

Ähnlich der eukaryotischen mRNA besitzt das Genom des Virus einen Poly-A-Schwanz am 3'-Ende. Anstelle der für Eukaryoten typischen „cap“-Struktur ist die RNA am 5' Ende kovalent mit dem viruskodierten Peptid VPg verknüpft. Das aus 7032 bp bestehende, einzelsträngige Positivstrang-RNA-Genom (ohne PolyA) enthält einen offenen Leserahmen, der bei Nukleotid 495 beginnt, bei Position 6896 endet und ein aus 2134 Aminosäuren bestehendes Polypeptid kodiert. Durch ein Alignment mit dem nahe verwandten Hepatitis A Virus wird die Spaltung des Polypeptids mittels viraler Proteasen in 11 Proteine vorgeschlagen, wovon vier Strukturproteine darstellen (Abbildung 1.2). Die Prozessierung des Polypeptids erfolgt co- und posttranslational durch viruskodierte Proteasen. Das Kapsidvorläuferprotein P1 wird durch die Protease 2A^{pro} von P2 und P3, den Vorläufern für die nicht-Strukturproteine, getrennt. In einem weiteren Prozessierungsschritt erfolgt die proteolytische Spaltung von P1 mittels der Protease 3C^{pro} in 1AB (VP0), 1D (VP1) und 1C (VP3). Nach Bildung des Provirus erfolgt die Spaltung der Vorläuferproteins 1AB in 1A (VP4) und 1B (VP2). Diese vermutlich autokatalytische Spaltung führt zur Infektiosität des Virus (Marvil *et al.*, 1999).

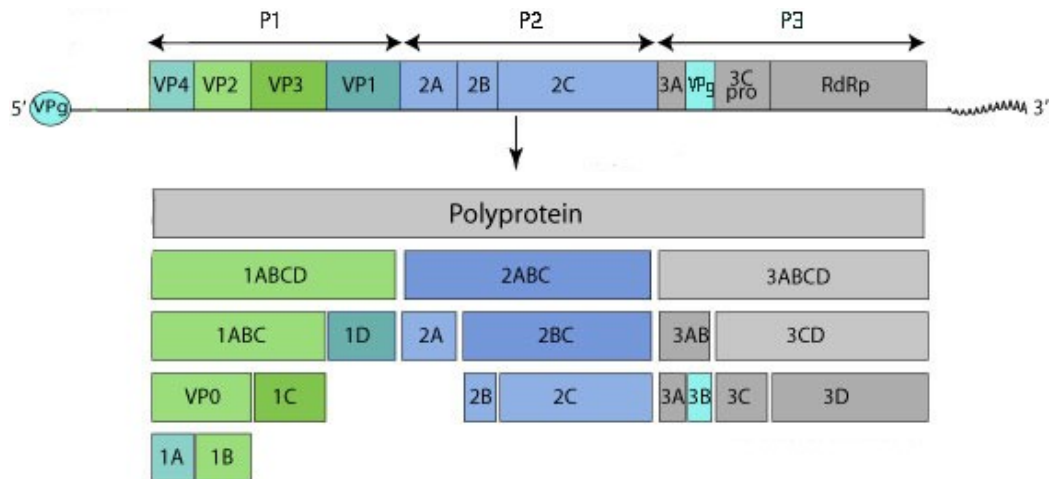


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der Polyproteinprozessierung eines Picornavirus. Dargestellt ist die Struktur des Polyproteins mit assoziiertem VPg Peptid und PolyA-Schwanz und die Abfolge der Prozessierung der Vorläuferproteine in die funktionalen Proteine.

Quelle: verändert nach http://expasy.org/viralzone/all_by_protein/33.html (10.8.2009)

Antikörper

Die erste Beschreibung eines Antikörpers, des Diphtherie-Antitoxins, erfolgte 1890 durch Emil von Behring und Shibasaburo Kitasato. Antikörper sind Proteine der humoralen Immunantwort von Vertebraten und ihre Aufgaben bestehen in der Opsonisierung von Pathogenen, der Neutralisierung von Toxinen und der Aktivierung des Komplementsystems. Sie werden als Reaktion auf in den Körper eingedrungene Fremdstoffe, sogenannte Immunogene, von den B-Lymphozyten produziert und ins Blutplasma abgegeben. Dort werden die Antigene erkannt und spezifisch durch die Antikörper gebunden (Janeway *et al.*, 2002).

Antikörpermoleküle besitzen eine Y-förmige Struktur und sind aus zwei identischen schweren und zwei identischen leichten Ketten aufgebaut. Die schweren Ketten sind mittels einer Disulfidbrücke in der Gelenkregion (hinge-region) miteinander verbunden, die die Flexibilität gewährleistet. Die kovalente Assoziation der leichten Kette mit der schweren Kette erfolgt ebenfalls über eine Disulfidbrücke (Abbildung 1.3 A). Das Molekulargewicht der Antikörpermoleküle liegt zwischen 146 und 970 kDa, abhängig vom Isotyp und dem Vorkommen von Multimeren (Davies und Metzger, 1983).

Bei der leichten Kette wird zwischen zwei Arten von Ketten unterschieden, κ und λ . Die schweren Ketten lassen sich in fünf Arten unterteilen, μ , δ , γ , α und ϵ . Am carboxyterminalen

Die Fab-Fragmente besitzen antigenbindende Aktivität und bestehen aus der vollständigen leichten Kette, sowie der V_H- und C_H1-Domäne der schweren Kette. Insgesamt weisen Fab-Fragmente eine Größe von ca. 50 kDa auf. Das Fc-Fragment wird aus der C_H2 und C_H3-Region der schweren Kette gebildet, welche über die Disulfidbrücken in der Gelenkregion verbunden sind (Porter 1959). Es aktiviert das Komplementsystem und vermittelt die Makrophagenbindung (Janeway *et al.*, 2002).

Das Fv-Fragment („fragment variable“) besteht aus den variablen Bereichen der leichten und der schweren Kette und ist somit das kleinste antigenbindende Antikörperfragment (Inbar *et al.*, 1972). Es wird nur durch intermolekulare Wechselwirkungen zwischen V_H und V_L stabilisiert. Dadurch neigt es einerseits dazu, in seine beiden Untereinheiten zu dissoziieren und ist andererseits sehr instabil (Plückthun, 1990).

Durch die Verknüpfung zweier Fv-Fragmente mittels eines synthetischen Peptidlinkers gelang die Darstellung eines scFv („single-chain variable Fragment“) (Abbildung 1.3 B) (Bird *et al.*, 1988; Huston *et al.*, 1988; Clackson *et al.*, 1991; Fuchs *et al.*, 1991; Breitling *et al.*, 1991). Meist findet die Verknüpfung des C-Terminus der V_H-Domäne mit dem N-Terminus der V_L-Domäne statt (Breitling und Dübel 1997). Der Linker von 15-20 Aminosäuren verleiht dem Fragment die nötige Stabilität und ermöglicht durch seine Flexibilität die korrekte Faltung der V-Regionen. Zusätzlich können V_H und V_L frei miteinander kombiniert werden, was neue Anwendungen ermöglicht (Marks *et al.*, 1991; Winter und Milstein, 1991).

Gegenüber Fab und Fv-Fragmenten besitzt der scFv den Vorteil einer geringen Größe von etwa 29 kDa. Die Penetration von Gewebe wird so erleichtert und durch die Kopplung mit Radioisotopen können hochauflösende röntgenkristallographische Bilder von Antigenbindestellen erzeugt werden (Winter und Milstein 1991; Beckman *et al.*, 2007). Auch das schnelle Vordringen zum Zielgewebe wird erleichtert, wobei die scFvs selbst weniger immunogen als Vollantikörper sind (Das *et al.*, 2004). Im Bereich der Diagnostik stellt die häufig schnelle und kostengünstige Produktion in prokaryotischen Systemen einen Vorteil gegenüber der Produktion von vollständigen IgGs in eukaryotischen Systemen dar. Bei therapeutischen Fragestellungen kommen aufgrund ihrer zusätzlichen Effektorwirkung überwiegend IgGs zum Einsatz (Schirrmann *et al.*, 2008). Ein Problem des scFv ist seine Neigung, sich bei zu hohen Konzentrationen zu Di- und Oligomeren zusammenzulagern, was eine spätere Selektion und Charakterisierung erschwert (Holliger *et al.*, 1993; Wörn und Plückthun, 2001).

Antikörpergenbibliotheken

Antikörpergenbibliotheken beinhalten die genetische Information einer Vielzahl von Antikörpern. Sie stellen ein komplexes Antikörperrepertoire für Selektionsverfahren zur Verfügung. Unterschieden wird je nach Spendermaterial grundsätzlich zwischen Immunbibliotheken und universellen oder „single pot“ Bibliotheken (Hust *et al.*, 2007). Für die Erstellung von Immunbibliotheken werden die variablen (V) Gene von IgG-sekretierenden Plasmazellen immunisierter Spender amplifiziert (Clackson *et al.*, 1991). Dies ermöglicht die Isolation bereits hochspezifischer, *in vivo* affinitätsgereifter Antikörper gegen das zur Immunisierung verwendete Antigen (Pelat *et al.*, 2007). Universelle Bibliotheken werden aus B-Lymphozyten nicht immunisierter Spender erzeugt. Diese Bibliotheken enthalten Informationen von Antikörper gegen nahezu alle Antigene, da bei der Konstruktion das IgM-Genrepertoire verwendet wird. Dies ermöglicht die Selektion von Antikörpern auch gegen Antigene wie toxische oder nicht immunogene Substanzen sowie körpereigene Antigene. Hierzu erfolgt die Klonierung in Phagemide (Marks *et al.*, 1991; Griffiths *et al.*, 1993).

„Phage Display“ und Panning

Bakteriophagen, kurz Phagen, sind Viren, deren Wirtsspektrum Bakterien umfasst. Als „Phage Display“ wird eine Methode bezeichnet, mittels derer Bakteriophagen genetisch so modifiziert werden, dass sie unterschiedlichste fremde Peptide oder Proteine produzieren und auf ihrer Oberfläche exponieren (Smith, 1985; Winter *et al.*, 1994; Willats, 2002). Für die Präsentation der Peptide und Proteine werden häufig die filamentösen Bakteriophagen M13 sowie fd und fl verwendet. Diese besitzen ein zirkuläres, einzelsträngiges DNA-Genom. Dieses kodiert für 11 verschiedene Proteine, wovon die Proteine pI, pIV und pXI am Zusammenbau und pII, pV und pX an der DNA-Replikation beteiligt sind. Die Hauptstruktur der Phagenhülle ist aufgebaut aus ca. 2 700 Kopien des Hüllproteins pVIII. An der Spitze der filamentösen Hüllstruktur befinden sich fünf bis acht Kopien des Hüllproteins pIII, welches am häufigsten für die Fusion mit Fremdproteinen genutzt wird. Zusätzlich sind noch die Proteine pVI, pVII und pIX am Aufbau der Phagenhülle beteiligt (Abbildung 1.3). Durch die Fusion eines fremden Peptids oder Proteins, wie z.B. eines scFvs, mit dem Phagenhüllprotein kann eine Phagenbank erstellt werden, wobei jeder Phage ein individuelles Genprodukt auf

seiner Oberfläche präsentiert (Marks *et al.*, 1991; Adey *et al.*, 1996).

Kodiert sind die Fusionsproteine auf Phagemiden mit einem Replikationsursprung für die Vermehrung in *E.coli* unter Kontrolle eines Promotors für die Expression in *E.coli*. Bei Assemblierung der Phagenpartikel werden diese Phagemide in die Phagen verpackt. Das erste Phage Display mit Antikörperfragmenten wurde Ende der 80er Jahre durchgeführt (Ward *et al.*, 1989).

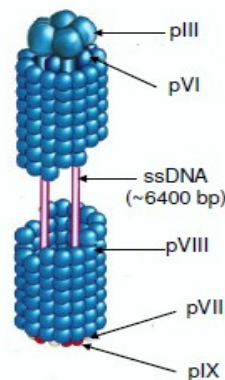


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung eines filamentösen Phagen. Dargestellt ist der Aufbau der Phagenhülle aus den Hüllproteinen pIII, pVI, pVIII, pVII sowie pIX und die verpackte einzelsträngige DNA. Quelle: Schneider (2005)

Die Verknüpfung des selektierbaren Phänotyps auf der Phagenoberfläche mit dem im Phagen codierten Genotyp ermöglicht eine zeitsparende Selektion. So kann auf die aufwändige Produktion monoklonaler Antikörper mittels der Hybridoma-Technologie und auf die Immunisierung von Tieren verzichtet werden (Marks *et al.*, 1991; Winter und Milstein, 1991). Ein weiterer Vorteil liegt in der hohen Diversität der Proteine, die präsentiert werden können (Willats, 2002).

Die Selektion erfolgt über das sogenannte Panningverfahren. Hierbei werden die Antikörpertragenden Phagen in Gegenwart des immobilisierten Antigens inkubiert, um eine spezifische Anlagerung von antikörpertragenden Phagen zu erreichen. Anschließend erfolgt eine Selektion der bindenden Phagen durch das Herauswaschen unspezifisch bindender Phagen. Die spezifisch bindenden Phagen werden eluiert und mit ihnen *E. coli*-Zellen über ihren F-Pilus infiziert. Die Amplifizierung der Phagenpartikel in den Bakterienzellen erfolgt unter Verwendung eines Helferphagen, welcher die genetische Information für die restlichen Phagenhüllproteine trägt. Der als „Hyperphage“ bezeichnete Helferphage trägt eine Deletion in dem für das pIII Protein kodierenden Gen. Dadurch erfolgt der Einbau des durch das

Phagemid kodierende pIII Fusionsprotein in die Phagenhülle (Rondot *et al.*, 2001). Die amplifizierten Phagen können in weiteren Selektionsrunden eingesetzt werden (Abbildung 1.5).

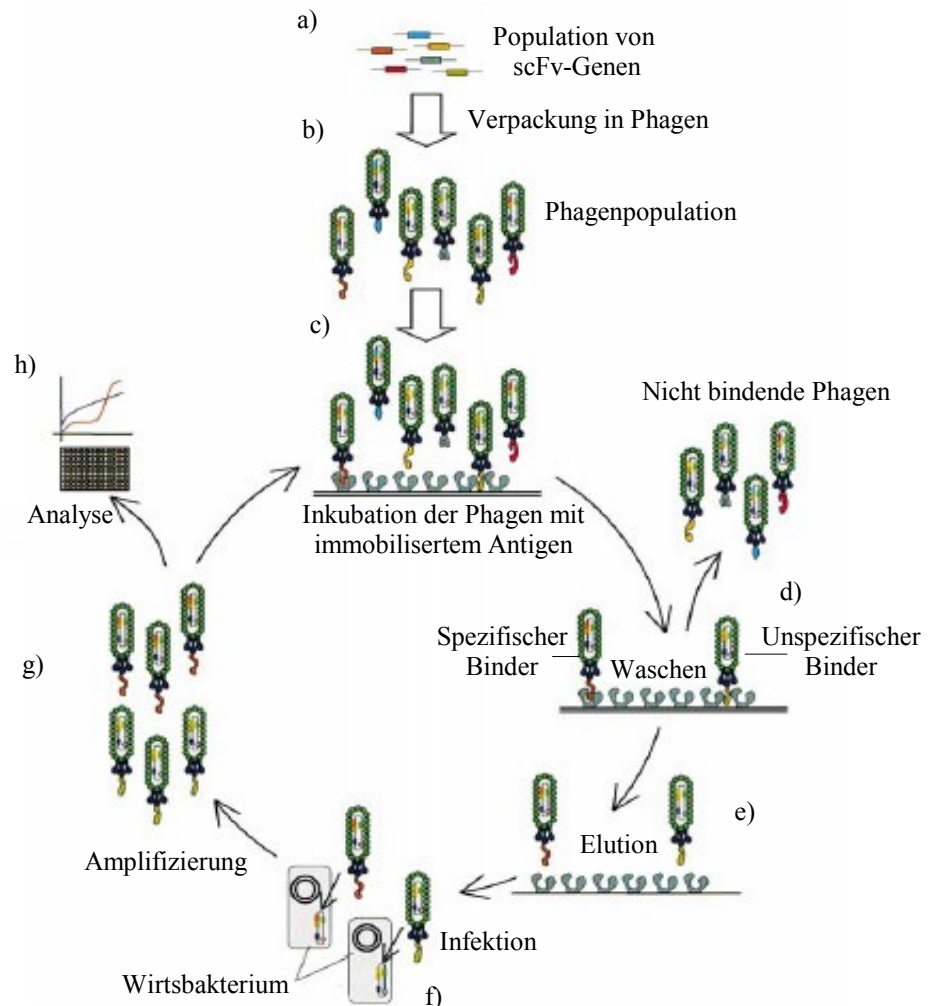


Abbildung 1.5: Prinzip des Panningverfahrens a) Isolierung der scFv Gene b) Verpackung der Gene in Phagen c) Selektion der Phagen d) Waschschrift e) Elution f) Infektion von Bakterien g) Amplifizierung h) Analyse der Phagen

Quelle: verändert nach Willats (2002)

Expression rekombinanter Antikörper in Pflanzen („Molecular Pharming“)

Die erste erfolgreiche Expression von Antikörpern in Pflanzen zeigten Hiatt und Mitarbeiter 1989 (Hiatt *et al.*, 1989). Im Anschluss wurde eine Vielzahl von rekombinanten Antikörpern mit unterschiedlichsten Anwendungen in Pflanzen produziert und erhielten die Bezeichnung „Plantibodies“. Die Vorteile dieses Systems sind vielfältig. Dazu gehören geringe Produktionskosten, Flexibilität in der Skalierbarkeit des Produktionsvolumens, Produktion großer Mengen an funktionalem Säugetierprotein und Abwesenheit von humanen Pathogenen in der Pflanze. Durch die Methoden der pflanzlichen Gewebekultur ist eine Immortalisierung und Aufrechterhaltung der Zelllinien möglich (De Jaeger *et al.*, 2000; Schillberg *et al.*, 2003; Horn *et al.*, 2004; Stoger *et al.*, 2005). Zur Steigerung der Proteinausbeute aus Pflanzen wurden zahlreiche Strategien entwickelt, wie die Konstruktion neuer pflanzlicher Expressionsvektoren und -kassetten. Eine entscheidende Bedeutung kommt hier auch der Lokalisation des Antikörperfragments innerhalb der Pflanzenzelle zu. Signifikant höhere Ausbeuten konnten bei der Anreicherung im Endoplasmatischen Retikulum (ER) gegenüber dem Cytosol erreicht werden (Conrad und Fiedler 1998). Für die Translokation erfolgt die Fusion des Antikörperfragments mit einem N-terminalen Signalpeptid. Durch das C-terminal fusionierte KDEL-Retentionssignal wird der Verbleib des Antikörperfragments im ER gesichert (Denecke *et al.*, 1992).

Aufgabenstellung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollen in Zusammenarbeit mit der Firma Lohmann Animal Health (LAH; Cuxhaven) und unter Förderung des Bundesministerium für Bildung und Forschung (BMBF) „single chain“ Antikörper (scFv) gegen das aviäre Enzephalomyelitis Virus entwickelt werden. Hierzu wird ein „Phage Display“ Verfahren eingesetzt und die Antikörper werden mittels eines Selektionsverfahrens („Panning“) aus einer semi-synthetischen Antikörpergenbibliothek isoliert. Als Antigene werden sowohl komplette Viruspartikel als auch ein rekombinant exprimiertes Hüllprotein eingesetzt. Die erhaltenen Antikörper sollen molekular- und immunbiochemisch charakterisiert und anschließend in Pflanzen produziert werden, um in einem „Enzyme-linked Immunosorbent Assay“ (ELISA) basiertem Testsystem zur Titerbestimmung von AEV Impfstoff zur Anwendung zu kommen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien entsprachen alle dem analytischen Reinheitsgrad. Sofern nicht anders angegeben, dienten als Bezugsquellen folgende Firmen:

Applichem (Darmstadt), Biomol (Hamburg), Fluka (Buchs, Schweiz), Roth (Karlsruhe), MBI Fermentas (St. Leon-Rot), Merck (Darmstadt), Roche Diagnostics (Mannheim), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich (Steinheim).

2.1.2 Oligonukleotide

<i>Bezeichnung</i>	<i>Verwendung</i>	<i>Sequenz (5'→3')</i>
scFv_VP2_20 r (1000)	Primer für die Klonierung von scFv VP2 20 in pCIPG	TAG TCA AGC TTG CCT AGG ACG GTC AGC TT
scFv_VP2_20 s (999)	Primer für die Klonierung von scFv VP2 20 in pCIPG	TAG CCA TCG ATG AGG TGC AGC TGG TGG AGT
pCIPGvorINTRON (990)	Primer für die Sequenzierung von pcIPG	CAT GGC CAA ACC TTT TCT GC
pcIPG_seqpro_for (989)	Primer für die Sequenzierung von pcIPG	CTA TGT TAC TAG ATC GAC CG
Agro_picA_rev (973)	Primer für die Kontrolle von Agrobakterien in der Multiplex-PCR	GAC GCA ACG CAT CCT CGA TCA GCT
Agro_picA_for (972)	Primer für die Kontrolle von Agrobakterien in der Multiplex-PCR	ATG CGG ATG AGG CTC GTC TTC GAG
scFv_multipl_rev (971)	Primer für die Insertkontrolle in der Multiplex-PCR	GAG CTG GAG CCA GAG AAT CGG
scFv_multipl_for (970)	Primer für die Insertkontrolle in der Multiplex-PCR	CCA GAG ACA ATT CCA AGA ACA CGC
Tef1Tabak_r (947)	Primer für die Kontrolle des Housekeeping-Gens TEF1 in der Multiplex-PCR	GGT TTC CAC ACG ACC AAC AGG GAC A

<i>Bezeichnung</i>	<i>Verwendung</i>	<i>Sequenz (5'→3')</i>
Tef1Tabak_s (946)	Primer für die Kontrolle des Housekeeping-Gens TEF1 in der Multiplex-PCR	GTG GTC ATT GGC CAC GTC GAC TCT G
pIPG-Seq1822r (884)	Primer für die Sequenzierung und Insertkontrolle von pIPG und pcIPG	GCA AAA ACA AAT GGG AAT GTA G
pIPG-Seq992s (882)	Primer für die Sequenzierung und Insertkontrolle von pIPG und pcIPG	GTC GAA TAA TTA CTC TTC GA
fdseq-2_rev (741)	Primer für die Amplifizierung von scFv-Genen aus pDN332	CGT TAG TAA ATG AAT TTT CTG TAT GAG GT
pASK_IBA45+_rev (734)	Primer für die Sequenzierung von pASK-IBA45+	GTG ACG CAG TAG CGG TAA AC
pASK_IBA45+_for (729)	Primer für die Sequenzierung von pASK-IBA45+	GAG AAA AGT GAA ATG AAT AGT TCG
VP2IBABamHI_rev (718)	Primer für die Klonierung von VP2 in pASK-IBA45+	GGT TTG GAT CCT GTG CGA CCA AGG GGC T
VP2IBASacI_for (717)	Primer für die Klonierung von VP2 in pASK-IBA45+	GGT TTG AGC TCT GGC GAA AAC ACT GAA TCA TAT G
AEV_P1_2a_Rev (644)	Primer für Amplifizierung der RT-PCR	GAA CAT TGG GCC TCC TCA AT
AEV_P1_2A_RT (643)	Primer für RT-PCR	TTT TGC CTT CTC TCC AC
AEV_P1_2a_For (642)	Primer für Amplifizierung der RT-PCR	AAG GGT AGC AAT TTA AAC ATG AG
LMB3MH_f2 (270)	Primer für die Amplifizierung von scFv-Genen aus pDN332	CAG GAA ACA GCT ATG ACC ATG ATT ACG CC
fdSeqMH_r2 (271)	Primer für die Amplifizierung von scFv-Genen aus pDN332	GAA TTT TCT GTA TGA GGT TTT GC
CDS23 (238)	Primer für die RT-PCR	TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTV N
BLBFB1-02CDRH3for (476)	Primer zur Kontrolle der Vollständigkeit von CDRH ₃	TCT CCT CCG TAT CAG
Fdseq1 (50)	Primer für die Amplifizierung von scFv-Genen aus pDN332	AATTTTCTGTATGAGG
CDS 28 (12)	OligodT Primer für reverse Transkription	TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TTT TVN

Die Synthese der Primer wurde durch die Firmen MWG Biotech (Ebersberg) und Invitrogen (Karlsruhe) durchgeführt.

2.1.3 Molekulargewichtsstandards

2.1.3.1 DNA-Standard

Zur Bestimmung der Größe von DNA-Fragmenten nach einer Agarosegelelektrophorese dienten die 100 bp *DNA-Ladder Plus* sowie die 1 kb *DNA-Ladder* (beide MBI Fermentas).

100 bp *DNA-Ladder Plus*: 100-900 bp, 1031 bp, 1200 bp, 1500 bp, 2000 bp, 3000 bp

1 kb *DNA-Ladder*: 10 000 bp, 8 000 bp, 6 000 bp, 5 000 bp, 4 000 bp, 3 500 bp, 3 000 bp, 2 500 bp, 2 000 bp, 1 500 bp, 1 000 bp, 750 bp, 500 bp, 250 bp

2.1.3.2 Proteinstandard

Zur Bestimmung des Molekulargewichts von Proteinen mittels SDS-PAGE wurde der „*Unstained Protein Molecular Weight Marker*“ der Firma Fermentas (St. Leon-Rot) eingesetzt. Dieser besteht aus den Proteinen β -Galaktosidase (116 kDa), Bovine Serumalbumin (66,2 kDa), Ovalbumin (45 kDa), Lactat Dehydrogenase (35 kDa), REase Bsp98I (25 kDa), β -Lactoglobulin (18,4 kDa) und Lysozyme (14,4 kDa).

2.1.4 Medien zur Anzucht und Selektion von Bakterien

Die Medien für die Anzucht und Selektion von *E. coli* und *A. tumefaciens* sind im Folgenden aufgeführt.

Zur Selektion der Bakterien wurde den Medien nach dem Autoklavieren und der Abkühlung auf etwa 50°C die entsprechenden Antibiotika zugefügt.

Zur Herstellung der Agarnährböden wurde zunächst ein Flüssigmedium aus Bactotrypton, Hefeextrakt, Natriumchlorid und H₂O erstellt. Der pH wurde mit NaOH auf 7,5 für TYE-Agar und 7,0 für YEP-Agar eingestellt. Anschließend wurde dem Medium Agar-Agar zugefügt.

2x TY

<i>Bezeichnung</i>	<i>Menge</i>
Bactotrypton	16 g
Hefeextrakt	10 g
NaCl	5 g
H ₂ O	ad 1 l

Der pH Wert des Mediums wird mit 10 M NaOH auf 7,5 eingestellt.

TB (Terrific Broth) Medium

<i>Bezeichnung</i>	<i>Menge</i>
Bactotrypton	12 g
Hefeextrakt	24 g
96% Glycerin	4 ml
H ₂ O	ad 900 ml

Nach dem Autoklavieren werden dem Medium 100 ml steriler Kaliumphosphat-Puffer (K₂HPO₄/ KH₂PO₄) zugegeben.

YEP-Medium

<i>Bezeichnung</i>	<i>Menge</i>
Bactotrypton	10 g
Hefeextrakt	20 g
NaCl	5 g
H ₂ O	ad 1 l

Der pH Wert des Mediums wird mit 10 M NaOH auf 7,0 eingestellt.

TYE-Agar

<i>Bezeichnung</i>	<i>Menge</i>
Bactotrypton	8 g
Hefeextrakt	5 g
NaCl	8 g
H ₂ O	ad 1 l
Agar-Agar	12 g

YEP-Agar

<i>Bezeichnung</i>	<i>Menge</i>
Bactotrypton	10 g
Hefeextrakt	20 g
NaCl	5 g
H ₂ O	ad 1 l
Agar-Agar	15 g

TYE-Agar mit 1% Glucose

Das Medium wurde wie oben beschrieben hergestellt. Nach dem Abkühlen wurden zusätzlich zum Antibiotikum noch 50 ml 20% (w/v) sterilfiltrierte Glucose zugesetzt.

2.1.5 Medien zur Anzucht und Selektion von *Nicotiana tabacum*

Zur Herstellung der Agarnährböden für die Anzucht und Selektion von *N. tabacum* wurde zunächst das Flüssigmedium mit den entsprechenden Hormonen erstellt und der pH mit KOH auf 5,8 eingestellt. Anschließend wurde dem Medium Plant Agar bzw. Gelrite zugefügt. Nach dem Autoklavieren und der Abkühlung auf etwa 50°C folgte die Zugabe der entsprechenden Antibiotika.

MS0-Medium

<i>Bezeichnung</i>	<i>Menge</i>
MS + Vitamine	4,4 g
Saccharose	30 g
MES	0,5 g
H ₂ O	ad 1 l

Kokultur-Medium

<i>Bezeichnung</i>	<i>Menge</i>
MS + Vitamine	4,4 g
Saccharose	30 g
MES	0,5 g
Acetosyringon	1 mM
Zeatin	1 mg
H ₂ O	ad 1 l
Gelrite	3 g

MSZ-Medium

<i>Bezeichnung</i>	<i>Menge</i>
MS + Vitamine	4,4 g
Saccharose	30 g
MES	0,5 g
Sulbactam	0,1 g
Ticarcillin	0,1 g
Zeatin	1 mg
H ₂ O	ad 1 l
Plant Agar	8 g

MS50-Medium

<i>Bezeichnung</i>	<i>Menge</i>
MS + Vitamine	2,2 g
Saccharose	15 g
MES	0,5 g
Sulbactam	0,1 g
Ticarcillin	0,1 g
Phosphinothricin	10 mg
H ₂ O	ad 1 l
Plant Agar	7 g

MSS-Medium

<i>Bezeichnung</i>	<i>Menge</i>
MS + Vitamine	4,4 g
Saccharose	30 g
MES	0,5 g
NAA	0,04 mg
BAP	0,5 mg
Sulbactam	0,1 g
Ticarcillin	0,1 g
H ₂ O	ad 1

2.1.6 Verwendete Stammlösungen**Antibiotika**

Im Folgenden findet sich eine Auflistung der verwendeten Antibiotika. Die Sterilfiltration der in Wasser und DMSO gelösten Antibiotika erfolgte mit Rotilabo 0,22 µm Spitzenfilter (Roth). Die Antibiotika wurden aliquotiert und bei -20°C gelagert.

<i>Bezeichnung</i>	<i>Lösungsmittel</i>	<i>Stammkonz.</i>	<i>Endkonz.</i>
Ampicillin	H ₂ O	100 mg/ml	100 µg/ml
Carbenicillin	H ₂ O	50 mg/ml	50 µg/ml
Kanamycin	H ₂ O	50 mg/ml	50 µg/ml
Rifampicin	DMSO	5 mg/ml	5 µg/ml
Streptomycin	H ₂ O	50 mg/ml	50 µg/ml
Sulbactam	H ₂ O	100 mg/ml	100 µg/ml
Tetracyclin	70% Ethanol	5 mg/ml	50 µg/ml
Ticarcillin	H ₂ O	100 mg/ml	100 µg/ml

20% (w/v) Glucose

Zur Erstellung einer 20% Glucoselösung wurden 20 g Glucose in 100 ml H₂O gelöst und anschließend mit Rotilabo 0,22 µm Spitzenfilter (Roth) sterilfiltriert. Bis zum Gebrauch erfolgte die Lagerung bei -20°C.

10x PBS Stammlösung

<i>Bezeichnung</i>	<i>Konzentration</i>
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	18,6 mM
Na ₂ HPO ₄ ·H ₂ O	95,5 mM
NaCl	1,5 M
H ₂ O	ad 1 l

Die Lösung wurde anschließend autoklaviert.

50x TAE-Puffer

<i>Bezeichnung</i>	<i>Konzentration</i>
Tris Ultra Pure	2 M
EDTA pH 8	50 mM
Essigsäure	5,71%

Die Lösung wurde anschließend autoklaviert.

2.1.7 Verwendete Puffer**Phosphat gepufferte Kochsalzlösung (PBS)**

1x PBS wird aus der 10x PBS Stammlösung mit H₂O verdünnt.

PBST

1x PBS + 0,05-0,1% Tween20 (Fluka)

1 M PBS (Neutralisationspuffer Panning)

<i>Bezeichnung</i>	<i>Konzentration</i>
NaCl	3 M
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	31 mM
Na ₂ HPO ₄ ·2 H ₂ O	200 mM
H ₂ O	ad 100 ml

Elutionspuffer Panning

0,1 M Glycin wird mit 25%iger HCl auf pH 2,8 eingestellt.

2.1.8 Antikörper

<i>Bezeichnung</i>	<i>Erkanntes Antigen</i>	<i>Herkunft</i>
<i>Anti-Strep-tag® II, cell culture supernatant, monoclonal</i>	Strep-tag II	biomol
<i>Flag peptide, mouse antibody</i>	Flag-Tag	Novitek
<i>Mab to M13, fd F1 Filamentous Phages</i>	M13	Progen
<i>Alkaline Phosphatase conjugated Affinity Purified Anti-mouse IgG (H&L) (Goat)</i>	Maus IgG	Rockland

2.1.9 Restriktionsenzyme

Alle verwendeten Restriktionsenzyme wurden von der Firma Fermentas (St. Leon-Rot) bezogen.

<i>Bezeichnung</i>	<i>Erkennungssequenz</i>
BamHI	5'...G↓GATCC...3' 3'...CCTAG↑G...5'
ClaI	5'...AT↓CGAT...3' 3'...TAGC↑TA...5'
HindIII	5'...A↓AGCTT...3' 3'...TTCGA↑A...5'
NcoI	5'...C↓CATGG...3' 3'...GGTAC↑C...5'
NotI	5'...GC↓GGCCGC...3' 3'...CGCCGG↑CG...5'
SacI	5'...GAGCT↓C...3' 3'...C↑TCGAG...5'
SalI	5'...G↓TCGAC...3' 3'...CAGCT↑G...5'

2.1.10 Bakterienstämme

Bakterienstamm (Herkunft)	Genotyp
<i>E. coli</i> XL1-Blue (Stratagene)	<i>supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46 thi relA1 lac- F'</i> [<i>proAB+</i> <i>lacI_q</i> Δ M15 TN10(<i>tetr</i>)]
<i>E. coli</i> BLR(DE3) (Novagen)	F- <i>ompT hsdSB</i> (<i>ts</i> - <i>mb</i> -) <i>gal dcm</i> Δ (<i>srl-recA</i>) 306:: <i>Tn10</i> (Tetr) (DE3)
<i>E. coli</i> TB1 (Novagen)	F- <i>ara D</i> (<i>lac-proAB</i>) <i>rpsL</i> F80 <i>lacZD</i> M15 <i>hsdR17</i> (<i>rK</i> - <i>mK</i> -)
<i>E. coli</i> Top10 (Invitrogen)	<i>mcrA</i> , Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>), Δ <i>lacX74</i> , <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>araD139</i> Δ (<i>ara-leu</i>)7697, <i>galK</i> , <i>rpsL</i> , <i>endA1</i> , <i>nupG</i>
<i>A. tumefaciens</i> EHA105 (Hood <i>et al.</i> , 1993)	

Der *E. coli* Stamm XL1 blue wurde für einige Anwendungen eingesetzt. Dieser zeichnet sich durch mehrere Merkmale aus. Das auf Minimalnährböden selektierbare F'-Episom ermöglicht die Ausbildung von F-Pili, die vom M13 Phagen erkannt und sowohl vom scFv-Phagen, als auch vom Helferphagen zur Infektion genutzt werden. Zusätzlich handelt es sich bei XL1 Blue um einen Suppressorstamm, d.h. er überliert das „amber“-Stoppcodon und produziert bei IPTG-Induktion ein Fusionsprotein, welches aus dem scFv und dem Hüllprotein pIII des Phagen besteht. So können nach der Infektion durch Phagen neue Phagenpartikel produziert werden.

2.1.11 Verwendete Vektoren

pASK-IBA45plus

Bei dem Vektor *pASK-IBA45plus* der Firma IBA GmbH (Göttingen) handelt es sich um einen Expressionsvektor für *E. coli*. Für die Selektion trägt der Vektor ein Ampicillin-Resistenzgen. Das Fremdgen liegt unter der Kontrolle des durch Anhydrotetracyclin induzierbaren *tetA*-Promotors. Zur einfachen Aufreinigung und Detektion des im Cytoplasma exprimierten Proteins besitzt der Vektor einen n-terminalen *Strep*-Tag sowie einen c-terminalen *His*-Tag (Abbildung 2.1).

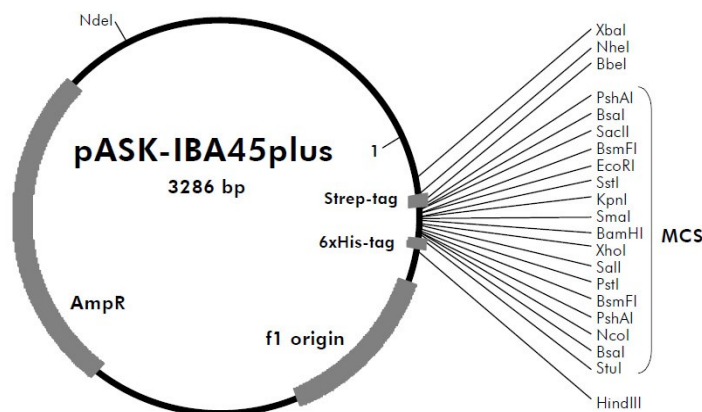


Abbildung 2.1: Vektorkarte von *pASK-IBA45plus* (Iba)

Quelle: Data Sheet pASK-IBA45plus

pCIPG+35S

Der Vektor pcIPG für die Transformation von Pflanzen beruht auf dem binären Vektor pCLEAN-G185 (Thole *et al.*, 2007), welcher auf Basis der pGreenII0000 entwickelt wurde. Als Helferplasmid kann pSoup eingesetzt werden. Der Vektor pcIPG trägt die IPG-Kassette, welche von Dr. Reinard und Dr. Frenzel des Instituts für Pflanzengenetik, Leibniz Universität Hannover, entworfen wurde und die in den Vektor pCLEAN-G185 integriert wurde. Zur Lokalisation des Proteins enthält die Kassette eine LeB4-Signalsequenz mit integriertem Polyubiquitin 10-Intron sowie ein KDEL-Retentionssignal. Die Detektion und Aufreinigung des rekombinanten Proteins kann über den beinhalteten Strep-tag, Flag-tag oder His-tag erfolgen. Das eingebrachte Gen liegt unter der Kontrolle des 2x35S Promotors (Odell *et al.*, 1985). Zur Selektion trägt der Vektor ein Kanamycin-Resistenzgen sowie ein Phosphinothricin-Resistenzgen unter der Kontrolle des nos-Promotors.

pDNEK

Bei dem Vektor pDNEK handelt es sich um den in der ETH-2 Bank verwendeten Phagemid-Vektor, ein Derivat des Vektors pDN322 (Pini *et al.*, 1998). Der Vektor trägt den Replikationsursprung des Phagen M13 zur Verpackung in Phagenpartikel sowie den colE1 ori zur Amplifizierung des Vektors in Bakterien. Um eine Selektion zu ermöglichen, befindet sich ein Ampicillinresistenzgen auf dem Vektor. Durch eine dem scFv-Gen vorgeschaltete pelB-Leadersequenz erfolgt die Sekretion des scFvs über den periplasmatischen Raum in das Medium. Ein „amber“-Stoppcodon zwischen dem D₃SD₃ Flag-HIS₆ Tag und dem gIII-Gen ermöglicht die Synthese des scFv entweder als Fusionsprotein mit dem gIII-Protein in

Suppressorstämmen (z.B. *E. coli* XL1 blue) oder als löslichen scFv in Nicht-Supressorstämmen (z.B. *E. coli* TB1). Mittels des D₃SD₃-Flag-HIS₆ wird eine Phosphorylierung (D₃SD₃) sowie ein immunochemischer Nachweis mittels der Tag-Sequenzen ermöglicht (Viti u. a. 2000).

Die Expressionskontrolle des scFv-Gens erfolgt über einen *lacZ*-Promotor, wodurch in Abhängigkeit der Glucose- bzw. IPTG-Konzentration inhibiert oder induziert werden kann. In Abbildung 2.3 ist eine schematische Darstellung des Vektors zu sehen.

pGEM®-T Easy Vector

Bei dem Vektor *pGEM®-T Easy* der Firma Promega (Mannheim) handelt es sich um einen Desoxythymidinüberhangvektor, wodurch die direkte Klonierung von PCR-Produkten mit Desoxyadenosinüberhang ermöglicht wird. Der Vektor stellt ein high-copy Plasmid dar, dessen multiple Klonierungsstelle in die *lacZ*-Kassette integriert ist. Somit können erfolgreich eingeführte Inserts auf entsprechendem Medium mittels Blau-Weiß Selektion identifiziert werden können. Zur Selektion in *E. coli* trägt der Vektor ein Ampicillinresistenzgen (Abbildung 2.2).

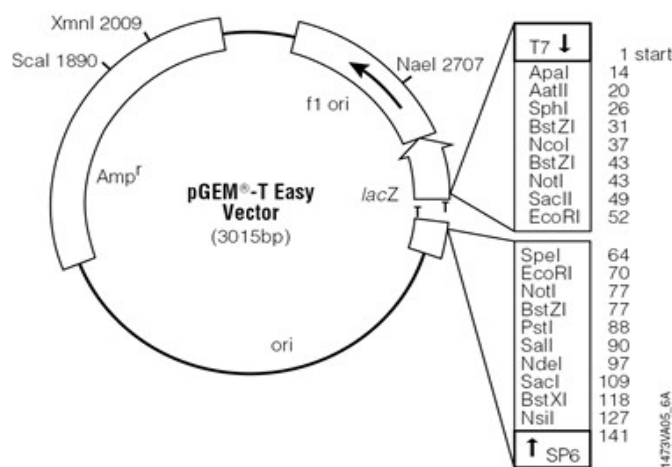


Abbildung 2.2: Vektorkarte des *pGEM®-T Easy* (Promega)

Quelle: Technical Manual pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems

2.1.12 ETH-2 humane Antikörper-Phagenbank

Die in dieser Arbeit verwendeten scFvs stammen aus der humanen ETH-2 Phagenbank, die auf dem scFv-Prinzip beruht (Pini *et al.*, 1998). Die VH und VL-Segmente wurden mit den

Restriktionsendonucleasen NcoI und NotI in einen neu konstruierten Phagemid-Vektor pDNEK (2.1.11) kloniert. In der Bank verwendet wurden dabei nur die humanen Keimbahnlinien DP-47 für die schwere Kette, DPK-22 und DPL-16 für die leichte Kette. Die Aminosäurepositionen 91, 93, 94 und 96 der CDRL₃ sowie die Positionen 95-98 der CDRH₃ wurden zufällig ausgetauscht, um eine größtmögliche Diversität der für die Epitoperkennung relevanten Bereiche zu gewährleisten (Padlan 1994). Durch die Verwendung des Keimbahngens DP-47 weisen die Antikörper eine spezifische Bindung zu Protein A auf, was eine Aufreinigung der scFvs ermöglicht. Zusätzlich ist die Tendenz zur Dimerbildung sehr gering (Ewert *et al.*, 2003; Lauer *et al.*, 2005). In Abbildung 2.3 ist die Struktur des Phagemidvektors der ETH-2 Bank und eines scFv dargestellt.

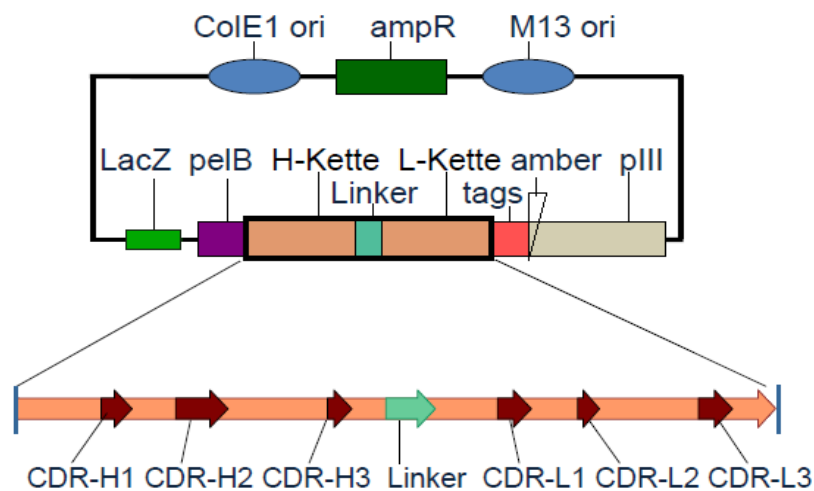


Abbildung 2.3: Struktur des Vektors pDNEK der ETH-2 humanen Antikörper-Phagenbank und eines scFv. Gezeigt sind das Gen für die Ampicillinresistenz sowie die Ori colE1 und M13, der lacZ-Promotor, die pelB-Leadersequenz, das amber-Stopcodon, das pIII (Phagenhüllprotein) sowie das scFv-Insert. Die Vergrößerung des Inserts zeigt die CDRs sowie den Linker.

2.1.13 Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller	Bezeichnung
Autoklav	Tuttnauer/Systec	5075 ELV
Bidestillationsanlage	Millipore	Milli-Q UF Plus
Blotter	Bio-Rad Laboratories	Trans-Blot SD
Chromatographiesystem	GE Healthcare	ÄKTAprime™ plus
Elektroeluter	Bio-Rad Laboratories	Modell 422 Electro-Eluter

<i>Gerät</i>	<i>Hersteller</i>	<i>Bezeichnung</i>
Elektrophoresekammern	Cosmo Bio	MyRun
	G&P Kunststofftechnik	H10 Mini vertikal
Elektroporator	Bio-Rad Laboratories	GenePulser® Cuvette
ELISA-Reader	Amersham Biosciences	Biotrak II Plate Reader
ELISA-Washer	Amersham Biosciences	Biotrak II
Feinwaage	Sartorius	handy
Homogenisator	Peqlab	Precellys 24
Inkubatoren	Braun	Certomat® HK
	Heidolph	Inkubator 1000
	Memmert	
Kühlzentrifugen	Sorvall Instruments	RC5C
	Thermo	Megafuge 1.0R
Magnetrührer	Omnilab	MR 3001 K
Oberflächenplasmonresonanz-messgerät	Eco Chemie	Autolab Esprit
pH-Meter	Metrohm	827 pH lab
Photometer	Pharmacia Biotech	Ultrospec 3000
Pipetten	Eppendorf	Reference
Schüttler	Braun	Certomat® R
	Heidolph	Unimax 1010
Sterilwerkbank	Holten LaminAir	HB 2448
	Biohit Antares	
	Kojair Tech Oy	KR-210 Safety
Taumeltisch	Kisker	Multi Bio 3D
Thermocycler	Biometra	T3 Thermocycler
	Eppendorf	Mastercycler personal
	Sensoquest	Labcycler
Tischzentrifuge	Sigma	01.01.15
Ultrazentrifuge	Sorvall	RC-5C
UV-Tisch	Vilbar Lourmat	TFX 35-C
Vakuumzentrifuge	Jouan	RC 10.22.
Videoprinter	Intas	DVP-1200
Vortexer	VELP Scientifica	2x ³
Waage	Sartorius	TE 153S
Wasserbad	GFL	

2.2 Methoden

2.2.1 Anzucht von Bakterienkulturen

2.2.1.1 Anzucht von *Escherichia coli* (*E. coli*)

Alle *E. coli*-Stämme wurden in 2x TY-Medium pH 7,5 angezogen. Ergänzt wurde das Medium mit sterilfiltriertem Ampicillin, Carbenicillin bzw. Tetracyclin. Als Festmedium wurde TYE-Agar eingesetzt, welchem sterilfiltriertes Ampicillin bzw. sterilfiltriertes Carbenicillin zugesetzt wurde. Eine Anzucht der Stämme erfolgte ausgehend von einer Einzelkolonie oder einer Glycerinstammkultur bei 37°C und 220 Upm über Nacht.

2.2.1.2 Anzucht von *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*)

Die Anzucht von *A. tumefaciens* erfolgte in YEP-Medium, ergänzt mit dem entsprechenden Antibiotikum. Als Festmedium wurde YEP-Agar verwendet, ebenfalls mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt. Die Anzucht der Stämme erfolgte ausgehend von einer Einzelkolonie oder einer Glycerinstammkultur bei 28°C und 220 Upm für ein bis zwei Tage.

2.2.2 Überexpression von scFv-Antikörpern in Bakterien

Ausgehend von Einzelkolonien wurden 5 ml TB-Medium mit 1% Glucose und 100 µg/ml Ampicillin beimpft und bei 37°C und 220 Upm über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurden mit den Übernachtskulturen in einer Verdünnung von 1:500-1:1 000 200 ml TB-Medium mit 1% Glucose und 100 µg/ml Ampicillin beimpft und bei 37°C und 220 Upm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8-0,9 inkubiert. Anschließend erfolgte eine Induktion mit 1 mM IPTG. Die weitere Inkubation erfolgte bei 28°C und 220 Upm über Nacht.

2.2.3 Überexpression von VP2 in Bakterien

Ausgehend von einer Einzelkolonie wurden 5 ml 2xTY-Medium TB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin beimpft und bei 37°C und 220 Upm über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurden mit der Übernachtskultur in einer Verdünnung von 1:1 000 100 ml 2xTY-Medium TB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin beimpft und bei 37°C und 220 Upm bis zu einer OD₅₅₀ von 0,6 angezogen. Anschließend erfolgte eine Induktion mit 20 µg Anhydrotetracyclin. Die weitere Inkubation erfolgte bei 28°C und 220 Upm über Nacht.

2.2.4 Anlage von „Glycerinstammkulturen“

Zur Anlage von Glycerinstammkulturen wurden 850 µl einer Übernachtskultur mit 150 µl sterilem 86% Glycerin versetzt, gut vermischt und sofort in flüssigen Stickstoff schockgefroren. Die weitere Lagerung der Kulturen erfolgte bei -80°C.

2.2.5 Photometrische Bestimmung der optischen Dichte (OD) von Bakterienkulturen

Die Bestimmung der optischen Dichte von Bakterienkulturen erfolgte im Photometer (Ultraspec 3000, Amersham Pharmacia Biotech). Gemessen wurde bei einer Wellenlänge von $\lambda = 600$ nm, das jeweilige Kulturmedium diente als Referenz. Die Standardisierung der exponentiellen Wachstumsphase einer Bakterienkultur erfolgte für den OD₆₀₀-Bereich von 0,4-0,5.

2.2.6 Plasmidisolation aus *E.coli*

Zur Isolation von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde basierend auf dem Prinzip der alkalischen Lyse nach Sambrook und Russell (2001) durchgeführt.

2.2.7 Quantifizierung von Nukleinsäure-Lösungen

Zur Quantifizierung des DNA bzw. RNA-Gehalts einer Lösung und zur Ermittlung ihrer Qualität wurde die OD₂₆₀ und die OD₂₈₀ gemessen. Hierzu wurde die zu messende Nukleinsäure mit H₂O verdünnt.

Absorption₂₆₀ x Verdünnungsfaktor x 50 = µg DNA/ml

Absorption₂₆₀ x Verdünnungsfaktor x 40 = µg RNA/ml

Für eine reine DNA-Lösung sollte der Koeffizient aus OD₂₆₀ und OD₂₈₀ bei 1,8 für reine RNA bei 2,0 liegen.

2.2.8 Sequenzierungen

Die DNA-Sequenzierungen wurden von der Firmen *MWG AG Biotech* (Ebersberg) oder Seqlab (Göttingen) nach Angaben des Dienstleisters durchgeführt.

2.2.9 Herstellung Hitzeschock-kompetenter Bakterien (*E.coli*)

Die Herstellung kompetenter *E. coli* Zellen für die Hitzeschocktransformation erfolgte mit Modifikationen nach Nakata *et al.* (1997) und Tang *et al.* (1994).

2.2.10 Transformation von *E. coli* mittels Hitzeschock

Die Transformation von kompetenten *E. coli* durch Hitzeschock erfolgte mit Modifikationen nach Nakata *et al.* (1997) und Tang *et al.* (1994).

2.2.11 Herstellung elektrokompeter Bakterien (*A. tumefaciens*)

Die Herstellung elektrokompeter Agrobakterien erfolgte nach Hartmann (2008).

2.2.12 Transformation von *A. tumefaciens* mittels Elektroporation

Auch die Transformation von elektrokompetenten Agrobakterien erfolgte nach Hartmann (2008).

2.2.13 Transiente Transformation von *N. benthamiana*

Die transiente Transformation wurde mit fünf bis sechs Wochen alten *Nicotiana benthamiana*-Pflanzen durchgeführt. Entsprechende *A. tumefaciens* EHA105 Bakterien wurden über Nacht angezogen. 1 ml der Kultur wurde für 10 min bei 1 000 x g und Raumtemperatur pelletiert und in 50 ml Infiltrationsmedium (28 mM D-Glucose; 50 mM MES; 2 mM Na₃PO₄ x 12 H₂O; 100 mM Acetosyringon) resuspendiert. Dieser Schritt wurde wiederholt. Anschließend wurden 1-3 Blätter mit der Suspension in einer Schale bedeckt und in einem Exicator für 10 min unter Vakuum gesetzt. Die infiltrierten Blätter wurden in Petrischalen mit feuchtem Whatman-Papier überführt und in verschlossenem Zustand für 3 Tage bei 23°C unter Langtagbedingungen mit einem Tag/Nacht-Rhythmus von 16/8 h kultiviert.

2.2.14 Stabile Transformation von *N. tabacum*

Für die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten stabilen Transformationen wurde ausschließlich *Nicotiana tabacum* cv. 'Petite Havana SR1' verwendet. Da es sich um eine *Agrobakterium* vermittelte Transformation, welche auf der auf der Blattstück Transformations- und Regenerationsmethode von (Horsch *et al.*, 1985) basierend, handelt, wurden zunächst die entsprechenden *A. tumefaciens* EHA105 Bakterien bis zu einer OD₆₀₀ von 0,8 bis 1,0 angezogen (2.2.1.2). Anschließend erfolgte eine Zentrifugation bei 4 000 x g für 10 min. Das Bakterienpellet wurde in MS0-Medium (2.1.5) resuspendiert, um eine OD₆₀₀ von 0,5 zu erhalten. Für die Transformation wurden etwa 1 cm² große Explantate von steril angezogenen *in vitro* Tabakpflanzen verwendet. Diese wurden für mindestens 15 min in der Bakteriensuspension inkubiert und anschließend auf Kokultur-Medium überführt. Nach zweitägiger Inkubation im Dunkeln bei 23°C wurden die Explantate dreimal mit sterilem H₂O gewaschen und danach für 20 min in MS0-Medium mit Ticarcillin inkubiert. Nach diesem Inkubationsschritt erfolgte die Regenerations- und Selektionsphase.

Über die im Medium enthaltenen Phytohormone erfolgte die Regeneration der Sprosse aus den Blattstücken. Auf transformierte Zellen wurde, basierend auf dem Markergen *npt I*, mittels Zusatzes steigender Konzentrationen des Totalherbizids Phosphinotricin (PPT), selektiert. Die Kultivierung der Blattexplantate erfolgte bei 23°C unter Langtagbedingungen mit einem Tag/Nacht-Rhythmus von 16/8 h.

In Regenerationsweg I erfolgte nach der Kokultur eine Umsetzung der Explantate für 4 Wochen auf MSZ-Medium (2.1.5) ohne PPT. Bei den nachfolgenden Subkulturen für jeweils 2 Wochen wurde die PPT-Konzentration von 5 mg/L um je 2,5 mg/L erhöht.

Regenerationsweg II verzichtete auf die PPT-freie Subkultur nach der Kokultur. Es erfolgte eine sofortige Selektion mit 5 mg/L PPT.

Zur Bewurzelung der Sprosse nach der Regeneration wurden diese auf MS50-Medium überführt und für weitere 4 Wochen kultiviert. Anschließend wurden die bewurzelten Sprosse in Einheitserde überführt und zur Akklimatisierung für 2 Wochen im Gewächshaus unter einer Polyethylenfolie kultiviert. Die akklimatisierten Pflanzen wurden im Gewächshaus unter Langtagbedingungen kultiviert.

Bei nicht abtötbaren Kontaminationen mit Agrobakterien während der *in vitro* Kultur wurden die regenerierten Sprosse vorzeitig ins Gewächshaus überführt und mit einer Auxinpaste in der Erde bewurzelt.

2.2.15 DNA-Isolation aus *N. tabacum*

Die Isolation von DNA aus Blattstücken von *N. tabacum* erfolgte nach Dorokhov und Klocke (1997).

2.2.16 RNA-Isolation aus *N. tabacum*

Die Isolation von Gesamt-RNA aus Blattmaterial von *Nicotiana tabacum* erfolgte mit dem Reagenz *RNATidy G* (Applichem, Darmstadt). 200 mg Blattmaterial wurden nach Probennahme in flüsigem Stickstoff tiefgefroren. Nach Zugabe von 1 ml *RNATidy G* wurde der Aufschluss im Precellys® 24 bei 6 800 x g für 30 s durchgeführt. Im Anschluss an eine 15 minütige Inkubation bei Raumtemperatur wurde für 10 min bei 12 000 x g und 4°C zentrifugiert. Bei Bedarf erfolgte eine Wiederholung dieses Schritts. Der Überstand wurde in

ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 200 µl Chloroform versetzt. Der Ansatz wurde für 15 s geschüttelt und bei Raumtemperatur für 3 min inkubiert. Durch einen Zentrifugationsschritt für 10 min bei 12 000 x und 4°C erfolgte eine Phasentrennung. 400 µl der oberen Phase wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 222 µl Fällungslösung (800 mM Natrium-Citrat, 1,2 M NaCl) sowie 222 µl eiskaltem Isopropanol versetzt. Nach einem Fällungsschritt für 10 min bei Raumtemperatur wurde für 10 min bei 12 000 x g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 1 ml 70% Ethanol für 5 min bei 12 000 x g und 4°C gewaschen. Die Aufnahme des getrockneten Pellets erfolgte in 20 µl DEPC-H₂O (0,01% (v/v) DEPC in H₂O). Um eine bessere Lösung der RNA zu erreichen, wurde die Probe für 10 min bei 65°C inkubiert. Der Überstand wurde nach einem kurzen Zentrifugationsschritt abgenommen. Zur Entfernung von möglichen DNA-Kontaminationen wurden ca. 4 µg RNA in einem 20 µl Ansatz mit 2 µl Dnase I (1 U/µl) (Fermentas, St. Leon-Rot) und 2 µl 10x Reaktionspuffer versetzt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 2 µl EDTA (25 mM) und einer Inkubation für 10 min bei 65°C wurde die Reaktion gestoppt.

2.2.17 Proteinextraktion aus *N. tabacum*

Für die Proteinextraktion aus *N. tabacum* wurden ca. 200 mg Blattmaterial zunächst in flüssigem Stickstoff eingefroren. Nach Zugabe des Extraktionspuffers (1x PBST; 1% Triton-X 100; 1 mM PMSF) erfolgte der Aufschluss des Blattmaterials mit Hilfe des *Precellys*[®] 24 der Firma Peqlab (Erlangen) für 30 s bei 6 800 Upm. Im Anschluss wurde für 15 min auf Eis inkubiert und dann für 10 min bei 12 000 x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Bei Bedarf erfolgte eine Wiederholung dieses Schritts.

2.2.18 Proteinextraktion aus *N. benthamiana*

Für die Proteinextraktion aus *N. benthamiana* wurden etwa 200 mg Blattmaterial in flüssigem Stickstoff eingefroren. Nach Zugabe des Extraktionspuffers (700 mM Saccharose; 500 mM Tris; 50 mM EDTA; 100 mM KCl; 2% β-Mercaptoethanol; 2% PMSF; pH 8,0) erfolgte der Aufschluss des Blattmaterials mit Hilfe des *Precellys*[®] 24 der Firma Peqlab (Erlangen) für 30 s bei 6 800 Upm. Anschließend erfolgte eine 10 minütige Inkubation auf

Eis. Zu der Lösung wurden 750 µl Phenol gegeben und für 30 min bei RT geschüttelt. Nach einer Zentrifugation für 10 min bei 12 800 x g und 4°C wurde die obere Phase in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit der gleichen Menge an Extraktionspuffer vermischt. Nach einer erneuten Zentrifugation für 10 min bei 12 800 x g und 4°C und Überführung der oberen Phase in ein neues Reaktionsgefäß, erfolgte die Zugabe des 4-5 fachen Volumens Fällungslösung (0,1 M Ammoniumacetat in Methanol). Die Inkubation wurde über Nacht bei -20°C durchgeführt. Im Anschluss fand ein Zentrifugationsschritt für 3 min bei 20 100 x g und 4°C statt. Das Pellet wurde dreimal in je 1 ml Fällungslösung aufgenommen und wie oben zentrifugiert. Abschließend erfolgte die Aufnahme in 1 ml 80% Aceton mit anschließender Zentrifugation für 3 min bei 20 100 x g und 4°C. Das Proteinpellet wurde getrocknet und in 100 µl 1xSSB aufgenommen.

2.2.19 Trichloressigsäurefällung

Die Entsalzung und Aufkonzentrierung von Proteingemischen wurde mittels einer Fällung mit Trichloressigsäure (TCA) durchgeführt. Hierzu wurde die Proteinprobe zunächst mit final 0,015% Natriumdeoxycholat (DOC) versetzt und für 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von final 10% TCA und eine mindestens 15 minütige Fällung auf Eis. Nach einem Zentrifugationsschritt für 10 min bei 12 000 x g und 4°C wurde das Pellet mit 1 ml eiskaltem 80% Aceton gewaschen, in dem wie oben beschrieben zentrifugiert wurde. Es folgte die Trocknung des Pellets und die Aufnahme in 1x SSB-Puffer (62,5 mM Tris/HCl, pH 6,8; 50 mM DTT; 10% (v/v) Glycerin; 2% (w/v) SDS; 0,01% (w/v) Bromphenolblau).

2.2.20 Restriktionsverdau

Die enzymatische Spaltung von Plasmiden sowie PCR-Produkten wurde mit Restriktionsendonukleasen der Firma Fermentas (St. Leon-Rot) durchgeführt. Typischerweise wurden Reaktionsansätze von 10-30 µl eingesetzt. Die Wahl des Puffers sowie das Verhältnis der Enzyme bei einer gleichzeitigen Spaltung mit zwei Enzymen wurden nach Herstellerangaben gewählt. Die Reaktion erfolgte bei 37°C für 1,5-16 h. Die Inaktivierung der Enzyme durch Hitzedenaturierung fand nach Herstellerangaben statt.

2.2.21 Dephosphorylierung

Für Dephosphorylierungen von geschnittenen DNA-Fragmenten wurde die *Shrimp Alkaline Phosphatase* (SAP) der Firma Fermentas (St. Leon-Rot) verwendet. Hierzu wurde in den Ansatz des Restriktionsverdaus 1 U SAP (1 U/ μ l) gegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert. Die anschließende Hitzedenaturierung erfolgte bei 65°C für 15 min.

2.2.22 Ligation

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Ligationen erfolgten mit der *T4-DNA-Ligase* (5 Weiss units/ μ l) der Firma Fermentas (St. Leon-Rot) im dazugehörigen Puffersystem. Verwendet wurde ein Vektor zu Insert Verhältnis von 1:10 bis 1:2. Pro 10 μ l Ligationsansatz wurden jeweils 5 Weiss Units eingesetzt. Die Inkubation des Ligationsansatzes erfolgte für 2 h bei 22°C.

2.2.23 Reverse Transkription

Für die reverse Transkription des AEV-Genoms wurde das *transcriptor first strand synthesis kit* der Firma Roche (Mannheim) laut Herstellerangaben verwendet.

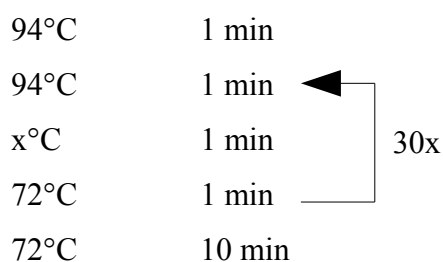
Für die reverse Transkription der isolierten RNA aus *N. tabacum* (2.2.16) wurde die *RevertAid® M-MuLV Reverse Transcriptase* der Firma Fermentas (St. Leon-Rot) verwendet. Hierzu wurde 1 μ l OligodT Primer (CDS 28 (12)) zu 12 μ l RNA gegeben und für 10 min bei 65°C inkubiert. Nach einer kurzen Kühlung auf Eis wurden dem Ansatz 4 μ l 5x *reaction buffer*, 2 μ l dNTP Mix (10 mM) und 1 μ l *RevertAid® M-MuLV Reverse Transcriptase* zugefügt. Schließlich wurde der Ansatz bei 42°C für 60 min inkubiert.

2.2.24 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für die Amplifizierung von DNA-Abschnitten wurde eine „Polymerase Chain Reaction“ (Polymerasekettenreaktion, PCR) nach Mullis *et al.* (1986) durchgeführt. Hierzu wurde die *GoTaq® Flexi DNA Polymerase* der Firma Promega (Mannheim) oder der *CombiZyme DNA Polymerase Mix* der Firma Invitex (Berlin) eingesetzt. In Folgenden sind die Standardansätze für die verschiedenen Polymerasen aufgeführt.

Bezeichnung	<i>GoTaq® Flexi DNA Polymerase</i>	<i>CombiZyme DNA Polymerase Mix</i>
zugehöriges Puffersystem	10 µl	2,5 µl
MgCl ₂ (25 mM)	5 µl	1,25 µl
dNTPs (10 mM)	1 µl	1 µl
Primer vorwärts (10 pM)	1 µl	1 µl
Primer rückwärts (10 pM)	1 µl	1 µl
weitere Zusätze	-	5 µl Optizyme Enhancer
Polymerase	0,25 µl (5 U/µl)	0,25 µl (4 U/µl)
Vorlage (1:10 bis 1:100 mit H ₂ O verdünnt)	1 µl	1 µl
H ₂ O	ad 25 µl	ad 25 µl

Das folgende Amplifizierungsprogramm wurde häufig verwendet:



2.2.25 Kolonie-PCR

Zur Kontrolle von Transformationen und zur Überprüfung der Vollständigkeit von Klonen nach der Selektion wurde eine Kolonie-PCR mit folgendem Ansatz durchgeführt:

5	µl 5x <i>Green GoTaq® Flexi Buffer</i> (Promega)
2,5	µl 25 mM MgCl ₂
1	µl 10 mM dNTPs
1	µl Primer forward (10 pM)
1	µl Primer reverse (10 pM)
0,25	µl <i>GoTaq® DNA Polymerase</i> 5 U/µl (Promega)
20,7	µl H ₂ O

In den Ansatz wurden mit einer Pipettenspitze einige Zellen einer Einzelkolonie einer Transformations- oder Selektionsplatte gegeben. Der Ansatz wurde gut gemischt und anschließend kurz anzentrifugiert.

Im Thermoblock durchlief der Ansatz folgendes Programm:

94°C	1 min	
94°C	1 min	
x°C	1 min	
2°C	1 min	
72°C	10 min	

2.2.26 Multiplex PCR

Mittels aus putativ transgenen Sprosse isolierter DNA (2.2.15) wurde eine Multiplex PCR durchgeführt, um die Integration des scFvs in das Pflanzengenom von *N. tabacum* zu überprüfen. Hierzu wurden 3 verschiedene Primerpaare in folgendem Ansatz verwendet:

5	μl 5x <i>Green GoTaq® Flexi buffer</i>
2,5	μl MgCl ₂ (25 mM)
1	μl dNTPs (10 mM)
1	μl Primer 970 (10 pM)
1	μl Primer 971 (10 pM)
1	μl Primer 972 (10 pM)
1	μl Primer 973 (10 pM)
0,25	μl Primer 946 (10 pM)
0,25	μl Primer 947 (10 pM)
1	μl Vorlage
0,4	μl <i>GoTaq®</i> DNA Polymerase (5 U/μl)
10,6	μl H ₂ O

Im Thermoblock durchlief der Ansatz folgendes Programm:

94°C	4 min	
94°C	30 s	
63°C	30 s	
68°C	30 s	
68°C	5 min	

2.2.27 Multiplex-RT PCR

Zur Überprüfung der Transkription des Antikörperfragments scFv VP2 20 in *N. tabacum* wurde eine Multiplex-RT PCR durchgeführt. Die cDNA (2.2.23) wurde hierzu in einer PCR mit zwei Primerpaaren in folgendem Ansatz eingesetzt:

5	μl 5x <i>Green GoTaq® Flexi buffer</i>
2,5	μl MgCl_2 (25 mM)
1	μl dNTPs (10 mM)
1	μl Primer 970 (10 pM)
1	μl Primer 971 (10 pM)
0,25	μl Primer 946 (10 pM)
0,25	μl Primer 947 (10 pM)
1	μl Vorlage
0,4	μl <i>GoTaq®</i> DNA Polymerase (5 U/ μl)
12,6	μl H_2O

Im Thermoblock durchlief der Ansatz folgendes Programm:

94°C	4 min	
94°C	30 s	
63°C	30 s	
68°C	30 s	
68°C	5 min	

2.2.28 Agarose-Gelelektrophorese

Um Größe und Vorhandensein von DNA-Fragmenten nach einer PCR, Transformation oder Selektion zu überprüfen, wurde eine Gelelektrophorese mit Modifikationen nach Rosidi (2002) durchgeführt.

2.2.29 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE wurde mit Modifikationen nach Hust (2002) durchgeführt.

2.2.30 Western-Blot

Der Transfer der im Polyacrylamidgel aufgetrennten Gele (2.2.29) auf die PVDF-Membran *PVDF Western Blotting Membranes* (Roche Diagnostics, Mannheim) erfolgte nach Hust (2002).

2.2.31 Proteinfärbungen

2.2.31.1 Ponceau-Färbung

Nach dem Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran wurde eine Färbung mittels Ponceau-Lösung (2% (w/v) Ponceau S, 3% (w/v) Trichloressigsäure) durchgeführt. Hierzu wurde die Membran 10 min in der Färbelösung inkubiert und anschließend mit H₂O entfärbt. Der Marker wurde abgeschnitten und zwischen Filterpapieren getrocknet.

2.2.31.2 Silberfärbung

Die Silberfärbung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen erfolgte nach Blum *et al.* (1987). Im Anschluss an die SDS-PAGE wurde das Gel für mindestens 1 h in Fixierer (50% (v/v) Methanol, 12% (v/v) Eisessig, 0,0185% (v/v) Formaldehyd, frisch angesetzt) gelagert. Anschließend wurde das Gel dreimal für je 20 min in 50% Ethanol gewaschen und danach für genau 1 min in Natriumthiosulfatlösung (10 mg Na₂S₂O₃ x 5 H₂O ad 50 ml H₂O) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit H₂O für je 20 s folgte die Färbung des Gels für 20 min in Silberlösung (0,5 ml 20% AgNO₃-Lösung, 37,5 µl 37% Formaldehyd ad 50 ml H₂O). Darauf wurde zweimal für je 20 s mit H₂O gewaschen und anschließend wurde das Gel im Entwickler (3 g Na₂CO₃, 24 µl 37% Formaldehyd, 1 ml Thiosulfatlösung ad 50 ml H₂O) für 1 bis 10 min bis zum Sichtbarwerden der Banden entwickelt. Nachdem zweimal für je 1 min mit H₂O gewaschen wurde, wurde die Entwicklungsreaktion mit Stopplösung (50% (v/v) Methanol, 12% (v/v) Eisessig) abgestoppt. Die Lagerung des Gels erfolgte in H₂O.

2.2.31.3 Coomassiefärbung

Die Coomassiefärbung von Proteinen in SDS-Polyacrylamidgelen erfolgte mit Modifikationen nach Hust (2002).

2.2.31.4 Immunfärbung

Zum Nachweis der rekombinanten Proteine wurden Immunfärbungen durchgeführt. Im Anschluss an den Western Blot wurde die PVDF-Membran zunächst für mindestens 1 h in einer Blockierungslösung (RotiBlock® (Roth) in 1x PBST) inkubiert. Danach wurde die Membran einmal kurz und einmal für 5 min mit 1x PBST gewaschen. Anschließend erfolgte die Inkubation für ein bis zwei Stunden mit dem entsprechenden Antikörper, welcher in 1x PBST mit 0,5x RotiBlock® verdünnt wurde. Nachdem erneut wie oben gewaschen wurde, wurde mit dem zweiten Antikörper, einem an alkalische Phosphatase gekoppeltem polyklonalem anti-Maus Antikörper aus Ziege in einer 1:1000 Verdünnung in 1x PBST mit 0,5x RotiBlock®, für 1 h inkubiert. Im Anschluss wurde erneut wie oben mit PBST gewaschen und daraufhin die Membran mit Substratpuffer (100 mM Tris, 0,5 mM MgCl₂; pH 9,5) einmal kurz und einmal für 5 min äquilibriert. Die Detektion erfolgte durch Zugabe von 20 ml Färbelösung (2 mg/ml 5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat (BCIP) und 6 mg/ml Nitroblau-Tetrazoliumchlorid (NBT) in Substratpuffer). Die gefärbte Membran wurde zur Abstopfung der Reaktion mit H₂O gewaschen und zwischen Filterpapier getrocknet.

2.2.32 Elektroelution

Die Elektroelution von Proteinen aus SDS-Polyacrylamid-Gelen wurde mit dem Elektroeluter der Firma Bio-Rad Laboratories durchgeführt. Hierzu wurde die entsprechende Bande zunächst aus dem Coomassie-gefärbten Gel ausgeschnitten und bei 10 mA für 4 h elektroeluiert. Als Dialysepuffer wurde 1x SDS-Laufpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin und 0,1% SDS, pH 8,3) verwendet.

2.2.33 Aufreinigung von Antikörpern über Protein A-Affinitätschromatographie

Aufgrund der in der ETH-2 Bank verwendeten Keimbahnlinie DP-47 konnte eine Aufreinigung aller scFvs über Protein A-Chromatographie erfolgen.

Die Bakterien einer 200 ml Expressionskultur (2.2.2) wurden durch einen Zentrifugationsschritt für 10 min bei 3 300 x g und 4°C pelletiert. Der Überstand wurde erneut für 45 min bei 24 400 x g – 48 300 x g (abhängig vom Abstand zur Rotationsachse im Festwinkelrotor) und 4°C zentrifugiert, um Verunreinigungen zu vermeiden und ein Zusetzen der Chromatographiesäule zu verhindern. Die Affinitätschromatographie wurde unter Verwendung der Säule *Pierce Chromatography Cartridges Protein A* (Pierce) mit einem Bettvolumen von 1 ml an der ÄKTAprime™ plus (GE Healthcare) durchgeführt. Hierzu wurde der Überstand der Expressionskultur nach Equilibrierung der Säule mit 10 ml Phosphatpuffer (100 mM NaH₂PO₄, 150 mM NaCl, pH 7,2) auf die Säule gegeben. Anschließend wurde mit 25 ml Phosphatpuffer gewaschen. Die Elution erfolgte mit 7 ml Elutionspuffer (0,1 M Glycin HCl, pH 2,8) und einer Fraktionsgröße von 0,5 ml in 50 µl vorgelegtes 1 M Tris HCl, pH 9 zur Neutralisierung des pH-Werts. Für die gesamte Aufreinigung wurde ein Drucklimit von 0,5 MPa sowie eine Flussrate von 1 ml/min verwendet.

2.2.34 Aufreinigung von Antikörpern über Histidin-Tag-Chromatographie

Zur Aufreinigung von scFvs wurde eine *HisTrap™ FF crude* Säule der Firma GE Healthcare mit einem Bettvolumen von 1 ml verwendet, an der Proteine über ihren Histidin-Tag aufgereinigt werden. Der Überstand der Expressionskultur wurde nach Equilibrierung der Säule mit 10 ml Laufpuffer (20 mM Na-Phosphat; 500 mM NaCl; 30 mM Imidazol; pH 7,4) aufgegeben. Im Anschluss wurde mit 20 ml Laufpuffer gewaschen. Es erfolgte eine Elution mit kontinuierlich ansteigenden Imidazolkonzentrationen von 0 auf 100% mit Elutionspuffer (20 mM Na-Phosphat; 500 mM NaCl; 500 mM Imidazol; pH 7,4) über ein Volumen von 20 ml. Die Eluatfraktionen wurden 1 ml-Schritten aufgefangen. Für die gesamte Aufreinigung wurde eine Flussrate von 1 ml/min und ein Drucklimit von 0,5 MPa verwendet.

2.2.35 Umpuffern von Antikörperfragmenten

Nach der Aufreinigung der scFvs (2.2.33) erfolgte eine Aufkonzentrierung und das Umpuffern in 1x PBS, pH 7,4. Hierzu wurden *Amicon® Ultra-15 Centrifugal Filter Devices 10.000 MWCO* (Millipore Corporation, Bedford MA, USA) nach Angaben des Herstellers verwendet. Für das Umpuffern wurde 2x mit je 10 ml 1x PBS und 1x mit 5 ml 1x PBS gewaschen.

2.2.36 Dialyse

Für die Dialyse von Proteinen wurde die Dialysemembran *ZelluTrans 6,0* (Roth) verwendet. Diese wurde zunächst für 30 min in H₂O eingeweicht. Danach erfolgte die Befüllung mit der Probe und die Dialyse über Nacht gegen 1x PBS, pH 7,4 bei 4°C unter Rühren.

2.2.37 Konzentrationsbestimmung von Antikörperfragmenten

Die Konzentration der eluierten Antikörper wurde photometrisch in einer 1:10 Verdünnung in PBS-Puffer mit PBS-Puffer als Blindwert bestimmt. Hierzu wurde die OD₂₈₀ gemessen. Die Umrechnung erfolgte über folgende Formel:

$$\text{OD}_{280} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 0,7 = \text{Proteinkonzentration [mg/ml]}$$

Zur Berechnung der Molarität wurde folgende Formel verwendet:

$$\text{Proteinkonzentration [mg/ml]} / 29\,000 = \text{Molarität [M]}$$

2.2.38 Aufreinigung von rekombinantem VP2-Protein

Für die Aufreinigung von bakteriell exprimiertem VP2-Protein (2.2.3) aus dem Cytoplasma wurde die Kultur für 15 min bei 3 300 x g und 4°C abzentrifugiert. Es folgte die Aufnahme des Pellets in 1 ml Puffer W (100 mM Tris/HCl, pH 8; 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) ergänzt mit 1 mM PMSF. Der Zellaufschluss erfolgte mittels Ultraschall mit dem Bandelin Sonopuls

(Bandelin) für 8x für je 30 s mit jeweils 30 s Pause mit einer Energie von 33% und einem Zyklus von 5. Die unlöslichen Bestandteile wurden anschließend durch einen Zentrifugationsschritt für 30 min bei 20 000 x g und 4°C von den Löslichen abgetrennt. Für die affinitätschromatographische Aufreinigung wurde eine *Strep-Tactin® Superflow® Cartridge H-PR* Säule (IBA) mit einem Bettvolumen von 1 ml verwendet. Diese wurde an der ÄKTAprime™ plus (GE Healthcare) mit einem konstanten Fluss von 1 ml/min und einem Drucklimit von 1 MPa betrieben. Zunächst wurde die Säule mit 5 ml Puffer W equilibriert. Anschließend erfolgte die Aufgabe des Überstands auf die Säule mit einem Probenvolumen von 3 ml. Nach einem Waschschrift mit 10 ml Puffer W erfolgte die Elution mit 3 ml Puffer E (100 mM Tris/HCl, pH 8; 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2,5 mM Desthiobiotin) und einer Fraktionsgröße von 0,5 ml.

2.2.39 Produktion von löslichen scFvs in Mikrotiterplatten

Für die Produktion von löslichen scFvs wurden Polypropylen Mikrotiterplatten (Nunc) verwendet. Zunächst wurden die Vertiefungen mit je 150 µl 2xTY-Medium ergänzt mit 1% Glucose und Ampicillin befüllt. Mit einer Pipettenspitze wurden die Antikörperklone gepickt und das Medium beimpft. Die Inkubation erfolgte bei 37°C und 1200 Upm über Nacht. Diese Platte diente als sogenannte Masterplatte. Am nächsten Tag wurde eine neue Mikrotiterplatte mit je 180 µl 2xTY-Medium ergänzt mit 1% Glucose und Ampicillin pro Vertiefung befüllt und mit je 10 µl der Kulturen der Masterplatte beimpft. Nach einer Inkubation bei 37°C und 1 200 Upm für 2 h erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei 1 500 x g für 15 min. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in je 180 µl 2xTY-Medium ergänzt mit Carbenicillin und 50 µM IPTG aufgenommen und über Nacht bei 30°C und 1200 Upm inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt für 15 min bei 1 500 x g und 4°C wurde der Überstand mit den löslichen scFvs in eine neue Mikrotiterplatte überführt und bis zur Verwendung bei 4°C gelagert.

2.2.40 ELISA

Die „Enzyme-linked Immunosorbent Assay“ (ELISA) wurden in einer *Maxisorb* Mikrotiterplatte (Nunc) durchgeführt. Hierzu wurden die Vertiefungen zunächst mit je 100 µl

AEV-Impfstoff (zur Verfügung gestellt von LAH) über Nacht bei 4°C unter Bewegung beschichtet. Der Überstand wurde abgenommen und die Vertiefungen zweimal mit je 200 µl PBST gewaschen. Zur Blockierung der freien Bindestellen wurde anschließend in jede Vertiefung für 1,5 h 250 µl Blockierungslösung gegeben und bei Rt inkubiert. Darauf folgten drei Waschschritte mit je 200 µl PBST. Zu jeder Vertiefung wurden 50 µl scFv haltiger Überstand der scFv-Anzucht in Mikrotiterplatten (2.2.39) gegeben und 50 µl Blockierungslösung und für 1,5 h bei RT unter Bewegung inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit je 200 µl PBST wurden je 100 µl *Flag peptide, mouse antibody* (Novitek) und 100 µl *Alkaline Phosphatase conjugated Affinity Purified Anti-mouse IgG (H&L) (Goat)* (Rockland) jeweils in einer Verdünnung von 1:1000 zugegeben und für 1,5 h bei RT unter Bewegung inkubiert. Anschließend erfolgte erneut ein dreimaliger Waschschritt mit je 200 µl PBST. Zur Detektion erfolgte die Zugabe von je 100 µl Substratlösung (1 M DEA, 1 mM MgCl₂, 0,2% di-Natrium-p-nitro-phenylphosphat). Die Messung erfolgte im ELISA-Lesegerät bei einer Wellenlänge von 405 nm und einer Referenzwellenlänge von 620 nm.

2.2.41 Anzucht von *E. coli* XL-1 blue für die Infektion mit Phagen

Für die Infektion von *E. coli* XL-1 blue Kulturen mit Phagen wurden die Bakterien zunächst auf M9-MM-Agarplatten ausgestrichen, um eine Selektion auf das F'-Episom zu bewirken. Die Anzucht erfolgte ausgehend von einer ÜNK in 2x TY-Medium ergänzt mit 1% Glucose und Ampicillin bei 220 Upm bis zu einer OD₆₀₀ von 0,32-0,34. Das weitere Wachstum bis OD₆₀₀ 0,4-0,5 wurde bei 40 Upm durchgeführt, um die gebildeten F-Pili keinen Scherkräften auszusetzen und die Infektion möglichst effizient durchzuführen. Mit einem Aliquot der Kultur wurden die Phageninfektionen (2.2.42) durchgeführt.

2.2.42 Phageninfektionen

Die Infektionen von Bakterienzellen mit scFv- oder Helferphagen erfolgten für 30 min bei 37°C ohne Bewegung.

2.2.43 Fällung der amplifizierten Phagen mit Polyethylenglykol

Zur Fällung der scFv-Phagen wurde die Zellkultur mit den reamplifizierten Phagen zunächst bei 10 800 x g für 10 min bei 4°C abzentrifugiert, um eine Trennung von Zellen und Phagen zu bewirken. Der phagenhaltige Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Phagen wurden mit 1/5 Volumen 20% Polyethylenglykol 6000 (PEG)/ 2,5 M NaCl für mindestens 1,5 h bei 4°C gefällt. Anschließend wurden die Phagen für 30 min bei 10 800 x g und 4°C abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 20 ml H₂O aufgenommen und die Phagen erneut mit 1/5 Volumen 20% PEG/ 2,5 M NaCl für 30 min bei 4°C gefällt und wie oben zentrifugiert. Das Pellet wurde in 500 µl 1x PBS aufgenommen. Es folgte eine Titerbestimmung der Phagenlösung (2.2.46).

2.2.44 Panning gegen VP2

Das Panning gegen das rekombinant exprimierte Hüllprotein VP2 wurde in Vertiefungen von *Maxisorb* Mikrotiterplatten (Nunc) durchgeführt. Zunächst wurden 100 µl der VP2-Proteinlösung (2.2.38) in eine Vertiefung gegeben und für 1 h bei RT auf dem Taumeltisch inkubiert. Eine andere Vertiefung wurde mit 150 µl Blockierungsreagenz befüllt und ebenfalls für 1 h bei RT auf dem Taumeltisch inkubiert. Die Lösungen wurden wieder abgenommen und die Vertiefungen dreimal mit je 200 µl PBST gewaschen. Anschließend wurden 100 µl scFv-Phagenlösung in die mit Blockierungsreagenz beschichtete Vertiefung gegeben und für 45 min bei RT auf dem Taumeltisch inkubiert. Die mit VP2 beschichtete Vertiefung wurde währenddessen für 45 min mit 150 µl Blockierungsreagenz inkubiert und danach dreimal mit 150 µl PBST gewaschen. Die vorselektierten scFv-Phagen wurden im Anschluss in die mit VP2 beschichtete Vertiefung überführt und für 2 h bei RT auf dem Taumeltisch inkubiert. Nach Abnahme der Phagenlösung folgten 10 Waschschriffe mit je 200 µl PBST gefolgt von 10 Waschschriffen mit je 200 µl PBS, wobei der letzte Waschschriff aufgefangen wurde. Abschließend wurde ein Elutionsschriff mit Glycin/HCl pH 2,8 vorgenommen. Es wurden 100 µl in die Vertiefung gegeben und für 15 min inkubiert. Anschließend wurden 100 µl 1 M PBS zur Neutralisation in die Vertiefung gegeben. Der Phagentiter des Eluats sowie des letzten Waschschriffs wurden bestimmt (2.2.46). Mit dem verbliebenen Eluat wurden 10 ml einer exponentiell wachsenden *E. coli* Kultur infiziert (2.2.42). Anschließend erfolgte ein Zentrifugationsschriff für 10 min bei 3 400 x g. Das Pellet

wurde in ca. 1 ml 2xTY gelöst und auf TYE-Medium mit 1% Glucose und Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die entstandenen Kolonien wurden für die Amplifizierung der scFv-Phagen verwendet (2.2.47).

2.2.45 Panning gegen AEV

Das Panning gegen das AE Virus wurde in Vertiefungen von *Maxisorb* Mikrotiterplatten (Nunc) durchgeführt. Zunächst wurde je 1 ml einer Probe mit aufgereinigten Viruspartikeln und eine Kontrollprobe ohne Viruspartikel (zur Verfügung gestellt von LAH) mit 3 ml PBS, pH 7,4 verdünnt. Dann erfolgte die Zugabe von 40% PEG 6000/ 1 M NaCl und die Fällung der Viruspartikel über Nacht bei 4°C. Ein Zentrifugationsschritt für 15 min bei 6 000 x g und 4°C führte zur Pelletierung. Das Pellet wurde anschließend in 200 µl 1x PBS, pH 7,4 aufgenommen. Je 100 µl Virus- bzw. Kontrolllösung wurden in eine Vertiefung der Mikrotiterplatte gegeben und über Nacht bei 4°C auf dem Taumeltisch inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte eine weitere halbstündige Inkubation bei Raumtemperatur. Die Lösungen wurden wieder abgenommen und die Vertiefungen dreimal mit je 200 µl PBST gewaschen. Zur Blockierung freier Bindestellen wurden je 150 µl Blockierungsreagenz (1x RotiBlock® in PBST) zugegeben, für 1 h auf bei Rt auf dem Taumeltisch inkubiert und anschließend 3x mit je 200 µl PBST gewaschen. 100 µl scFv-Phagenlösung wurden zur Deselektion in die mit virusfreier Kontrolllösung beschichtete Vertiefung gegeben und für 30 min bei RT auf dem Taumeltisch inkubiert. Die vorselektierten scFv-Phagen wurden im Anschluss in die mit AE Virus beschichtete Vertiefung überführt und für 2 h bei RT auf dem Taumeltisch inkubiert. Nach Abnahme der Phagenlösung folgten 15 Waschschriffe mit je 200 µl PBST, gefolgt von 15 Waschschriffen mit je 200 µl PBS, wobei der letzte Waschschriff aufgefangen wurde. Abschließend wurde ein Elutionsschriff mit Glycin/HCl pH 2,8 vorgenommen. Es wurden 100 µl in die Vertiefung gegeben und für 15 min inkubiert. Die Neutralisierung erfolgte mit 100 µl 1 M PBS. Die Phagentiter des Eluats sowie des letzten Waschschriffs wurden bestimmt (2.2.46). Mit dem verbliebenen Eluat wurden 10 ml einer exponentiell wachsenden *E.coli* Kultur infiziert (2.2.42). Anschließend erfolgte ein Zentrifugationsschriff für 10 min bei 3 400 x g. Das Pellet wurde in ca. 1 ml 2xTY gelöst und auf TYE-Medium mit 1% Glucose und Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die entstandenen Kolonien wurden für die Amplifizierung der scFv-Phagen verwendet (2.2.47).

2.2.46 Titerbestimmung

Für die Titerbestimmung wurden von der Phagensuspension Verdünnungen von 10^{-2} bis 10^{-12} in 1x PBS erstellt und mit jeweils 10 µl je 50 µl Bakterienkultur infiziert (2.2.42).

Die infizierten Zellen wurden anschließend auf TYE-Agar mit Ampicillin ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Anhand der Anzahl der gebildeten Kolonien konnte unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors die Anzahl der koloniebildenden Einheiten („colony forming units“, cfu) pro ml Phagensuspension berechnet werden.

2.2.47 Amplifizierung der scFv-Phagen

Die reinfizierten *E. coli* XL1 blue Zellen wurden mit 5 bis 10 ml 2xTY-Medium von den Platten geschabt und vereinigt. Mit den Bakterien wurden 50 ml 2xTY-Medium, supplementiert mit Ampicillin und Glucose, angeimpft und wie unter 2.2.41 beschrieben, angezogen. Von der übrigen Suspension wurden Glyceroldauerkulturen angelegt. 10 ml der Kultur wurden dann mit dem Helferphagen (Hyperphage, Progen) im Verhältnis 1:20 infiziert (2.2.42). Die infizierten Bakterien wurden für 10 min bei 3400 x g und 4°C abzentrifugiert und in 100 ml 2xTY-Medium supplementiert mit Ampicillin und Kanamycin aufgenommen. Die Amplifizierung erfolgte bei 30°C und 220 Upm über Nacht.

2.2.48 Desoxycholat-Screening (DOC)

E. coli Suppressorstämmen (z.B. XL1 Blue), die das scFv-pIII Fusionsproteins exprimieren, besitzen eine erhöhte Sensitivität gegenüber dem anionischen Detergenz Desoxycholat (DOC) (Li *et al.*, 2002).

Zur Überprüfung von XL1 Blue Klonen auf Expression des scFv-Gens wurden diese auf TYE-Nährboden ergänzt mit Ampicillin und 10% DOC und zur Kontrolle auf TYE-Nährboden ergänzt mit Ampicillin ohne DOC überimpft und über Nacht bei 37°C angezogen. Die im Vergleich zur Kontrolle nur schlecht oder gar nicht gewachsenen Klone wurden einzeln auf TYE-Nährboden, ergänzt mit Ampicillin und Glucose, angezogen und weitergehend analysiert.

2.2.49 Bindungsanalysen von Antikörperfragmenten

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Bindungsanalysen hinsichtlich Spezifität und Affinität erfolgten an einer Autolab Esprit (Eco Chemie). Diese ermöglicht durch einen Biosensor die markierungsfreie Detektion von Molekülinteraktionen in Echtzeit, welche auf dem Prinzip der Oberflächen-Plasmonresonanz („surface plasmon resonance“, SRP) beruht. Es handelt sich um eine optische Messtechnik, welche die Massenkonzentration von Biomolekülen auf der Sensoroberfläche misst. Dabei werden Veränderungen im Refraktionsindex nahe der Sensoroberfläche detektiert (Johnsson *et al.*, 1991).

Die Oberflächenplasmonresonanz kommt zustande bei der Reflektion von Licht von einer leitenden Schicht im Grenzbereich zweier Medien mit unterschiedlichen Refraktionsindices. Die Autolab Esprit erzeugt dieses Phänomen mithilfe eines gläsernen Chips, der auf der einen Seite eine leitende Gold- auf der anderen eine Dextranbeschichtung aufweist. Tritt SRP auf, kommt es bei einem bestimmten Reflektionswinkel zu einer Reduktion des reflektierten Lichts. Der Reflektionswinkel ist abhängig vom Refraktionsindex der Probe auf der Dextranseite des Chips. Bindet während einer Messung ein Molekül an die Sensoroberfläche kommt es zu einer Massenveränderung, welche proportional zum Refraktionsindex ist (Johnsson *et al.*, 1991). Durch die Veränderung des Refraktionsindex ändert sich der Reflektionswinkel des Lichtintensitätsminimums. Zeichnet man diesen Verlauf einer Messung gegen die Zeit auf, ergibt sich ein Sensorgramm, dessen Maßeinheit für die Veränderung in Resonanzeinheiten („resonance unit“, RU) angegeben wird (Abbildung 2.4). Eine Resonanzeinheit entspricht einer Veränderung der Proteinkonzentration von 1 pg/mm².

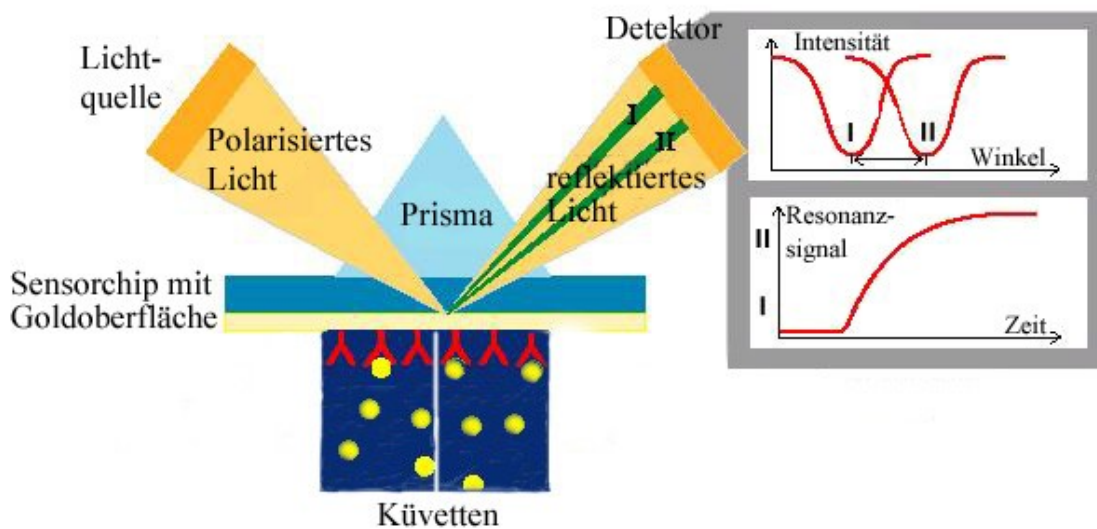


Abbildung 2.4: Prinzip der Oberflächenplasmonresonanz. Polarisiertes Licht wird auf die Oberfläche eines goldbeschichteten Chips gestrahlt. Dessen Rückseite ist mit einem Liganden beschichtet, an den der Analyt bindet. Durch die Massenzunahme wird eine Veränderung des Refraktionsindices und damit des Reflektionswinkels bewirkt.

Die Autolab Esprit arbeitet mit einem offenen Küvetten-System, welches eine Küvette für die Bindungsanalysen beinhaltet und eine Küvette für Referenzmessungen. Beide Küvetten sind parallel zu beschicken.

2.2.49.1 Kopplung des Sensorchips

Durch die Derivatisierung der Chipoberfläche mit einer flexiblen, hydrophilen Matrix aus Carboxymethyldextran wird eine kovalente Bindung von Liganden ermöglicht. Diese wird in dieser Arbeit durch nukleophile Austauschreaktionen an N-hydroxysuccinimide (NHS) Estern erreicht (Johnsson *et al.*, 1995). Hierzu wurde die *SPR Sensordisc Au* (Xantec, Münster) über Nacht in 1 mM 11-Mercaptoundecanoic acid (11-MUA) inkubiert, um eine Thioloberfläche an der mit Gold beschichteten Oberfläche des Chips zu erzeugen. Am nächsten Tag wurde der Chip zunächst mit H_2O und dann mit 96% Ethanol gewaschen. Der getrocknete Chip wurde in die Autolab Esprit eingelegt, um dort die Kopplung mit dem Liganden vorzunehmen. Hierzu erfolgte eine Aktivierung der Chipoberfläche mit N-Hydroxy-Succinimid (NHS) und EDC (Dimethylaminopropyl-N'-Ethylcarbodiimid N-3-hydrochlorid). Hierbei werden die

Carboxymethylgruppen zu N-Hydroxysuccinimid-Estern umgesetzt. Anschließend erfolgte die Kopplung der Viruspartikel in beiden Küvetten über spontane Reaktionen der primären Amine am Protein mit den NHS-Estern. Durch Ethanolamin wurde eine Deaktivierung der nicht abreagierten NHS-Ester erreicht. Für die Kopplung wurde das Kopplungsprotokoll des Herstellers nach dessen Angaben verwendet.

2.2.49.2 Affinitätsmessungen von Antikörperfragmenten

Für die Affinitätsmessungen der scFvs wurden diese in 1x PBS, pH 7,4 umgepuffert (2.2.35) und die Konzentration photometrisch bestimmt (2.2.37). Anschließend wurden Verdünnungen in 1x PBS erstellt. Als Laufpuffer diente 1x PBS, pH 7,4, für die Regeneration 0,1 M Glycin/HCl, pH 2,8. Für die Messungen wurde das automatische Protokoll *Curve a full kinetic plot* – 50 µl des Herstellers verwendet. Hier wurden folgende Parameter eingestellt:

Grundlinie:	120 s
Assoziierung:	900 s
Dissoziierung:	600 s
Regeneration:	120 s
Intervall 1:	120 s
Intervall 2:	60 s
Intervall 3:	60 s
Intervall 4:	60 s

2.2.50 Computergestützte Datenauswertung

2.2.50.1 DNA-Sequenzen

Die Analyse und Bearbeitung von DNA-Sequenzen erfolgte mit dem Programm Vector NTI Advance 9 (InforMax, Invitrogen life science software).

2.2.50.2 SPR-Daten

Für die Darstellung und Auswertung der Daten wurde das Programm Kinetic Evaluation der Firma Eco Chemie B.V., Version 5.0, verwendet.

3 Ergebnisse

3.1 Klonierung des rekombinanten Virushüllproteins VP2

Der Ausgangspunkt des Pannings gegen das rekombinante Hüllprotein VP2 des aviären Enzephalomyelitis Virus bildete die Überexpression dieses Proteins in *E. coli*. Hierzu musste eine reverse Transkription von Teilen des Virusgenoms erfolgen, um eine Klonierung des *VP2*-Gens in einen Expressionsvektor zu ermöglichen.

Die (+)-Strang RNA des AE Virus wurde aus einem Homogenat von infizierten Küken, welches von LAH zur Verfügung gestellt wurde, isoliert (2.2.23). Der gesamte für *P1*- und *2A*-Gene kodierende Abschnitt wurde revers transkribiert und amplifiziert. Die reverse Transkription erfolgte mit dem Primer AEV_P1_2A_RT (643) (Abbildung 3.1 A). Für die anschließende Amplifizierung des Genabschnitts *P12A* wurden die Primer AEV_P1_2a_For (642) und AEV_P1_2a_Rev (644) verwendet (Abbildung 3.1 B).

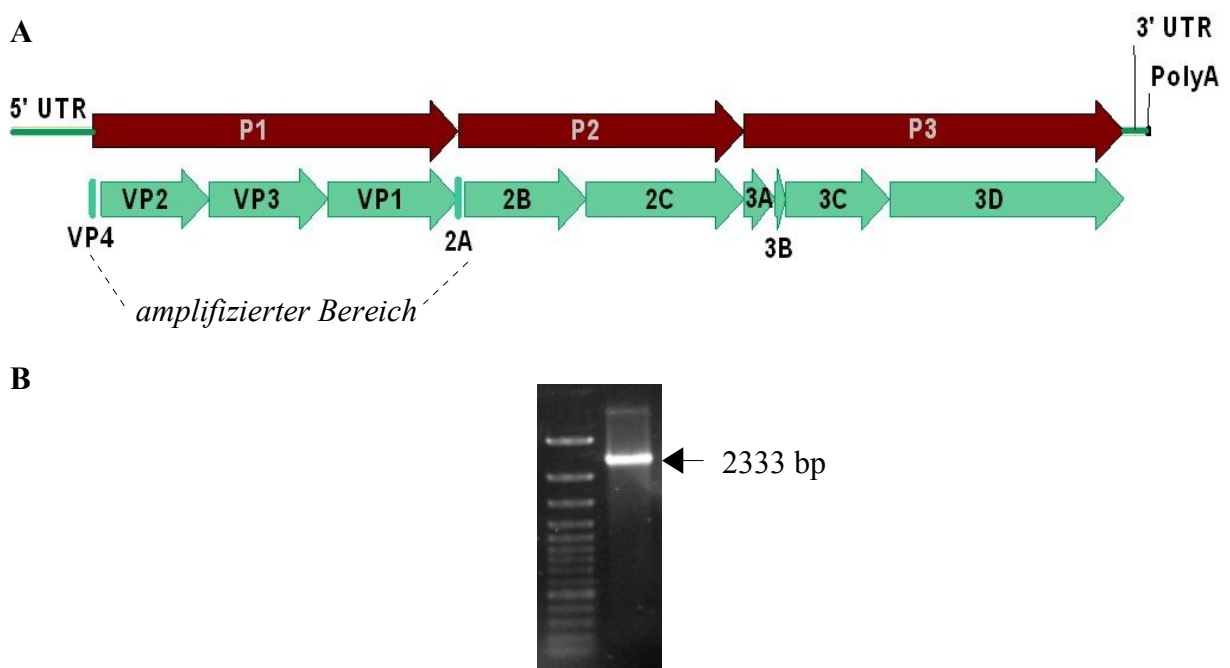


Abbildung 3.1: Abbildung des durch reverse Transkription amplifizierten Bereichs des AEV Genoms.

A: Grafik des AEV-Genoms. Der amplifizierte Bereich umfasst die Gene *VP4*, *VP2*, *VP3*, *VP1* sowie *2A*.

B: Ergebnis der RT-PCR mit anschließender Amplifizierung von *P12A*. Eingesetzt wurden die Primer AEV_P1_2a_For (642) und AEV_P1_2a_Rev (644) bei einer Anlagerungstemperatur von 51°C und einer Elongationszeit von 180 s. Bahn 1= Marker; Bahn 2= Amplifikat. Die Bande von 2333 bp stellt den Genbereich vom *VP4*-Gen bis zum *2A*-Gen dar.

Die Klonierung des 2 333 bp großen Fragments erfolgte mittels TA-Klonierung in den Vektor *pGEM[®]-T Easy* (Promega) (2.1.11) zur Konstruktion des Vektors *pGEM P12A*. Aus dem Vektor *pGEM P12A* erfolgte die Amplifizierung des *VP2*-Genabschnitts mit den Primern *VP2IBASacI_for* (717) und *VP2IBABamHI_rev* (718). Für die bakterielle Expression wurde das 688 bp große Fragment des *VP2*-Gens mit den Restriktionsenzymen *Bam*H1 und *Sac*I geschnitten und zwischen diese Restriktionsschnittstellen des Expressionsvektors *pASK-IBA45+* (IBA) (2.1.11) ligiert (Abbildung 3.2). Dieser bakterielle Expressionsvektor besitzt einen *tetA*-Promotor, welcher durch Anhydrotetracyklin induzierbar ist.

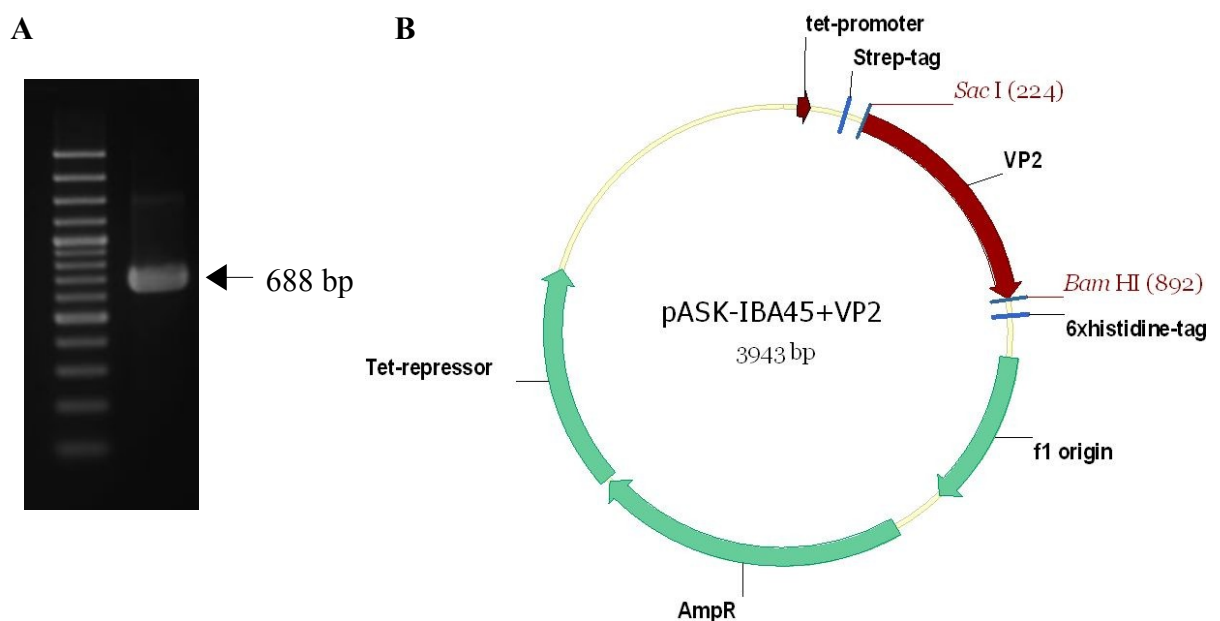


Abbildung 3.2: Konstruktion des Expressionsvektors pASK-IBA45+VP2.

A: Ergebnis der PCR zur Amplifizierung des *VP2*-Gens. Eingesetzt wurden die Primer *VP2IBASacI_for* (717) und *VP2IBABamHI_rev* (718) mit einer Anlagerungstemperatur von 57°C und einer Elongationszeit von 60 s. Bahn 1= Marker; Bahn 2= Amplifikat. Die Bande bei 688 bp entspricht dem amplifizierten *VP2*-Gen.

B: Vektorkarte von pASK-IBA45+VP2. Das amplifizierte *VP2*-Gen wurde über die Restriktionsschnittstellen *Sac*I und *Bam*HI in den Vektor kloniert und liegt unter der Kontrolle des *tetA*-Promotors.

3.2 Expression und Aufreinigung des rekombinanten Virushüllproteins VP2

Die Expression des rekombinanten Virushüllproteins VP2 fand im *E. coli* Stamm TB1 statt. Die Induktion des *tetA*-Promoters erfolgte mit 200 ng/ml über Nacht bei 28°C (2.2.3). Der Aufschluss der pelletierten Zellen einer 100 ml Expressionskultur wurde per Ultraschall durchgeführt. Der abzentrifugierte Überstand wurde über eine *Strep-Tactin® Superflow® Cartridge H-PR* Säule (IBA) an der ÄKTApriTM plus gegeben (2.2.38). Die Elution erfolgte stufenlos mit Desthiobiotin (Abbildung 3.3).

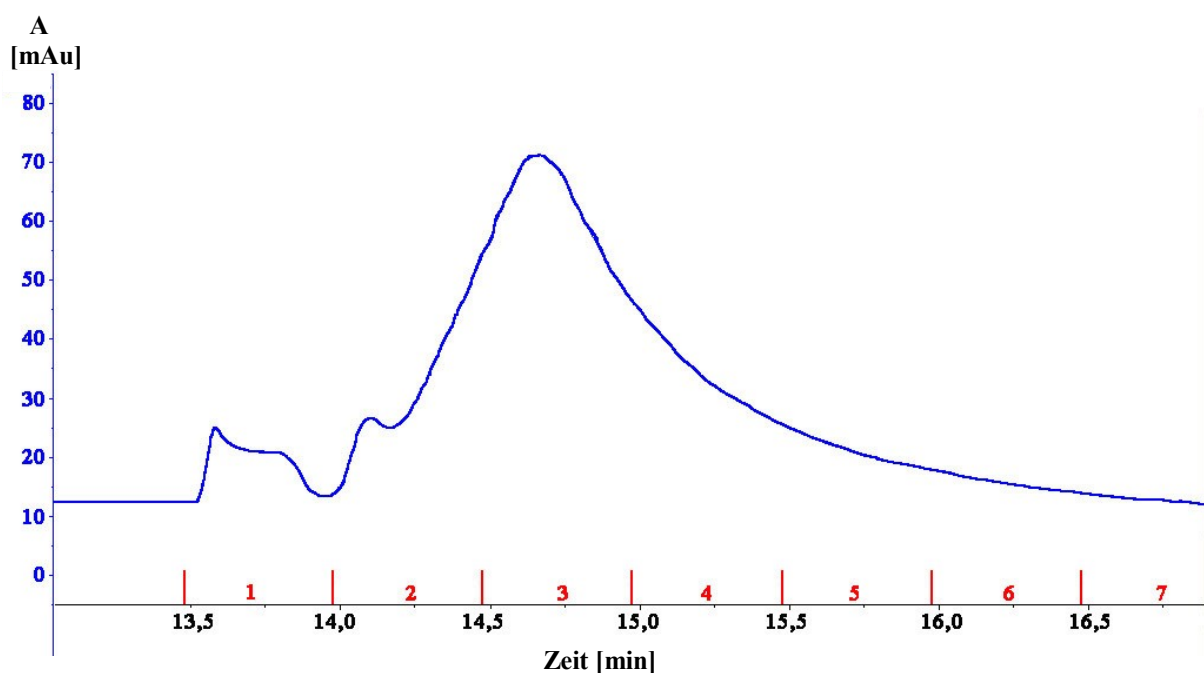


Abbildung 3.3: Verlaufsprotokoll der Aufreinigung von VP2 über eine *Strep-Tactin® Superflow®* Säule an der ÄKTApriTM plus. Dargestellt ist der Verlauf der UV-Absorption bei 280 nm (blaue Linie). Die Elution erfolgte stufenlos mit Desthiobiotin mit einer Fraktionsgröße von 0,5 ml. Die Absorption bei 280 nm in mAu ist über der Zeit in min aufgetragen. Zusätzlich sind die Eluatfraktionen (rot) auf der x-Achse angegeben.

Deutlich ist ein Anstieg in den Eluatfraktionen 2 bis 4 zu erkennen, wobei der größte Anstieg in Fraktion 3 festzustellen ist.

Zur Überprüfung der Aufreinigung wurden Aliquots der verschiedenen Eluatfraktionen mittels SDS-PAGE (2.2.29) aufgetrennt und mit Coomassie angefärbt (Abbildung 3.4).

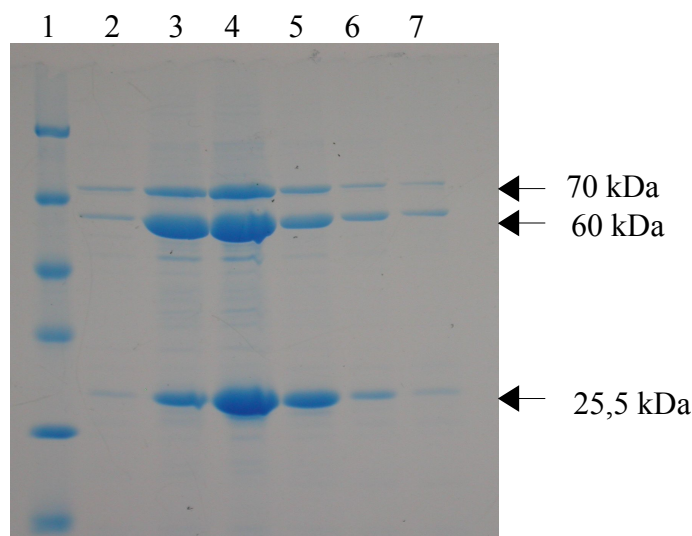


Abbildung 3.4: Aufreinigung des rekombinanten VP2-Proteins aus der cytoplasmatischen Proteinfraction von *E. coli* mittels einer Strep-Tactin Superflow Säule, aufgetrennt auf einem Polyacrylamidgel (12%) und mit Coomassie angefärbt. Aufgetragen wurden je 15 µl der eluierten Fraktionen 1 bis 6 des Säulenlaufs (Bahn 2-7). Von dem Marker (Bahn 1) wurden 10 µl aufgetragen. Deutlich ist eine starke Anreicherung von Protein in den Elutionsfraktionen 2 bis 4 zu erkennen.

Die Färbung der Eluatfraktionen (Abbildung 3.4) bestätigt die Anreicherung von VP2-Protein in den Fraktionen 2 bis 4, welche auch das Verlaufsprotokoll (Abbildung 3.3) zeigte. Die stärkste Proteinbande für das VP2-Protein ist in Fraktion 3 zu verzeichnen.

Da zusätzlich zur erwarteten Bande bei 25,5 kDa für das VP2-Protein intensive Banden bei 60 und 70 kDa detektiert wurden, erfolgte eine Identifizierung dieser Proteine. Die Banden bei 60 kDa und 70 kDa der Elutionsfraktion 3 wurden ausgeschnitten und mittels Tandem-MS durch das Institut für klinische Chemie der Campus Forschung Hamburg analysiert. Die Auswertung des MS/MS-Spektrums identifizierte die 60 kDa Bande als Heatshock Protein 60 (Hsp60) und die 70 kDa Bande als Heatshock Protein 70 (Hsp70).

Da durch die Verunreinigungen mit den Heatshock Proteinen die Verwendung des unaufgerinigten Eluats als Antigen im Panningverfahren nicht möglich war, wurden die VP2 Banden der Elutionsfraktionen 2, 3 und 4 aus dem Polyacrylamidgel ausgeschnitten und die Proteine mittels eines Elektroeluters der Firma Bio-Rad Laboratories Laboratories aus dem PAA-Gel eluiert (2.2.32). Abschließend erfolgte eine Dialyse des VP2-Proteins gegen 1x PBS. Die erfolgreiche Aufreinigung wurde mittels SDS-PAGE (2.2.29) überprüft (Abbildung 3.5). Durch diesen zusätzlichen Aufreinigungsschritt wurde eine Proteinprobe mit reinem VP2-Protein erhalten, welches als Antigen im Panningverfahren eingesetzt werden konnte.

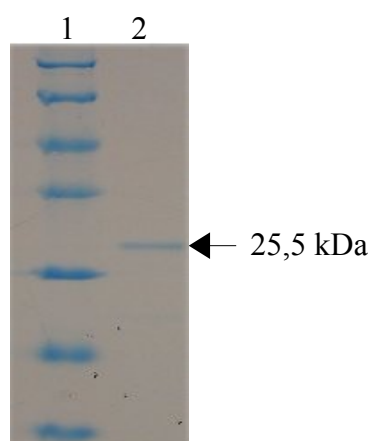


Abbildung 3.5: Aufreinigung des rekombinanten VP2-Proteins der cytoplasmatischen Proteinfraktion von *E.coli* mittels einer *Strep-Tactin® Superflow®* Säule und anschließender Elektroelution aus einem Polyacrylamidgel, aufgetrennt auf einem Polyacrylamidgel (12%) und mit Coomassie angefärbt. Aufgetragen wurden in Bahn 2 15 µl des dialysierten Proteins und in Bahn 1 10 µl Marker. Zu sehen ist eine einzelne Bande bei 25,5 kDa, die dem VP2-Protein entspricht.

3.3 Selektion auf Antigen-spezifische scFv-Phagen gegen VP2 (Panning)

Zur Selektion von AEV-spezifischen scFv-Phagen wurde rekombinant exprimiertes und aufgereinigtes VP2-Protein (3.2) als Antigen im Panning eingesetzt. Es wurden drei Panningrunden durchgeführt (2.2.44). Aufgrund verschiedener Ausbeuten bei der Amplifizierung und Fällung der Phagen (2.2.43) wurde in den Panningrunden eine unterschiedliche Anzahl von Phagen eingesetzt: In der ersten Runde waren es $3,5 \times 10^{11}$, in der zweiten Runde 1×10^{12} und in der dritten Runde 6×10^{11} . Nach Bindung der scFv-Phagen erfolgten 15 Waschschrte mit PBST und anschließend 15 Waschschrte mit PBS (2.2.44). In Tab. 3.1 sind die absoluten Zahlen der Phagen aufgeführt. Bei den Abbildungen werden zur besseren Vergleichbarkeit die Werte in „parts per million“ (ppm) angegeben. Die ermittelte Phagenanzahl der jeweiligen Fraktionen in cfu/ml wird dabei auf die im Panning anfänglich eingesetzte Phagenkonzentration in cfu/ml bezogen. In Abbildung 3.6 ist der Verlauf des Phagentiters des letzten Waschschrts mit PBS sowie der sauren Elution mit Glycin/HCl der drei Selektionsrunden dargestellt.

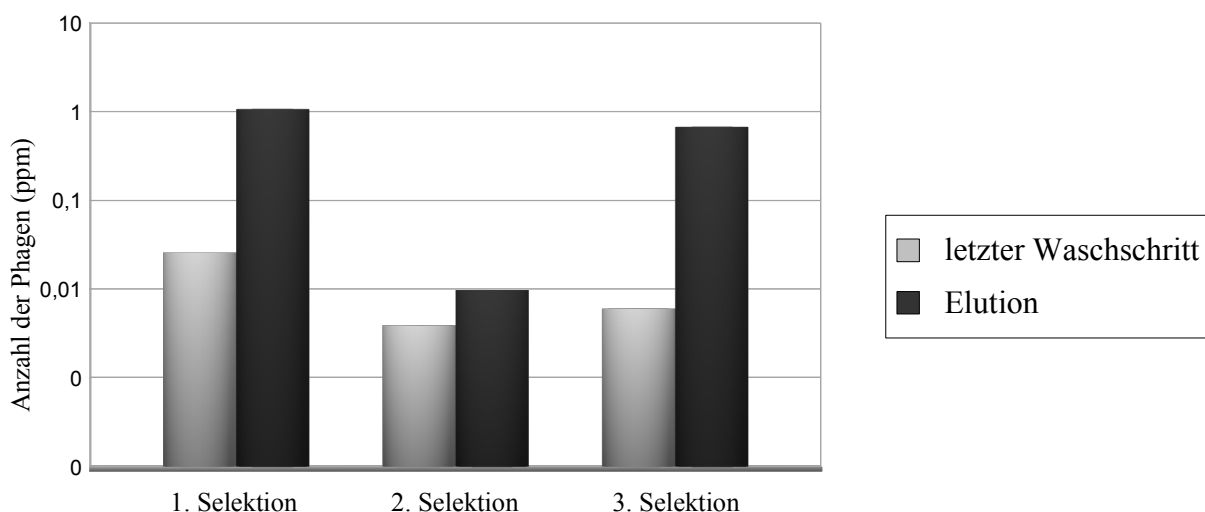


Abbildung 3.6: Titerverlauf der drei Selektionsrunden gegen VP2. Der Phagentiter für den letzten Waschschrift mit PBS sowie der sauren Elution mit Glycin HCl, pH 2,8, ist in cfu/ml in ppm bezogen auf die zum Panning eingesetzte Phagenanzahl in cfu/ml. Die y-Achse ist logarithmisch skaliert.

Im Verlauf der Selektionsrunden zeigte sich bei der Elution zunächst ein Abfall des Titers, um dann in der dritten Selektionsrunde wieder anzusteigen. Der Phagentiter des letzten Waschschriffs folgt dem Verlauf des Titers der Elution. Deutlich ist aber zu erkennen, dass das Verhältnis zwischen Eluatfraktion und Waschschrift in der dritten Selektionsrunde am größten ist.

Tab. 3.1: Absolute Werte der eingesetzten Phagen sowie der Titerbestimmungen des letzten Waschschriffs und der Elution der drei Selektionsrunden gegen VP2.

	<i>1. Selektionsrunde</i>	<i>2. Selektionsrunde</i>	<i>3. Selektionsrunde</i>
<i>Eingesetzte Phagen</i>	$3,5 \times 10^{11}$	1×10^{12}	6×10^{11}
<i>letzter Waschschrift</i>	9×10^3	$3,9 \times 10^3$	$3,6 \times 10^3$
<i>Elution</i>	$3,7 \times 10^5$	$9,7 \times 10^3$	4×10^5

Alle Angaben in cfu.

3.4 Selektion auf Antigen-spezifische scFv-Phagen gegen AEV (Panning)

Für die Selektion von AEV-spezifischen scFv-Phagen wurden von Lohmann Animal Health zur Verfügung gestellte, aufgereinigte Viruspartikel als Antigen im Panning eingesetzt. Es wurden drei Selektionsrunden durchgeführt (2.2.45). Die unterschiedlichen Ausbeuten bei der Amplifizierung und Fällung der Phagen führten zu unterschiedlichen Ausgangstitern in den drei Panningrunden. In der ersten Runde wurden 1×10^{10} Phagen eingesetzt, in der zweiten Runde 5×10^{11} und in der dritten Runde 1×10^{12} . Zur Deselektion unspezifischer Phagen wurde vor der Inkubation mit der Antigenpräparation in der ersten und zweiten Panningrunde eine halbstündige Inkubation mit einer Präparation aus virusfreiem Huhn vorgenommen. Nach der Deselektion und Bindung erfolgten zehn Waschschriffe mit PBST und zehn Waschschriffe mit PBS (2.2.45). In Abbildung 3.7 ist der Verlauf des Phagentiters des letzten Waschschriffs mit PBS sowie der sauren Elution mit Glycin/HCl dargestellt. In Tab. 3.2 sind die absoluten Zahlen der Titerbestimmungen aufgeführt.

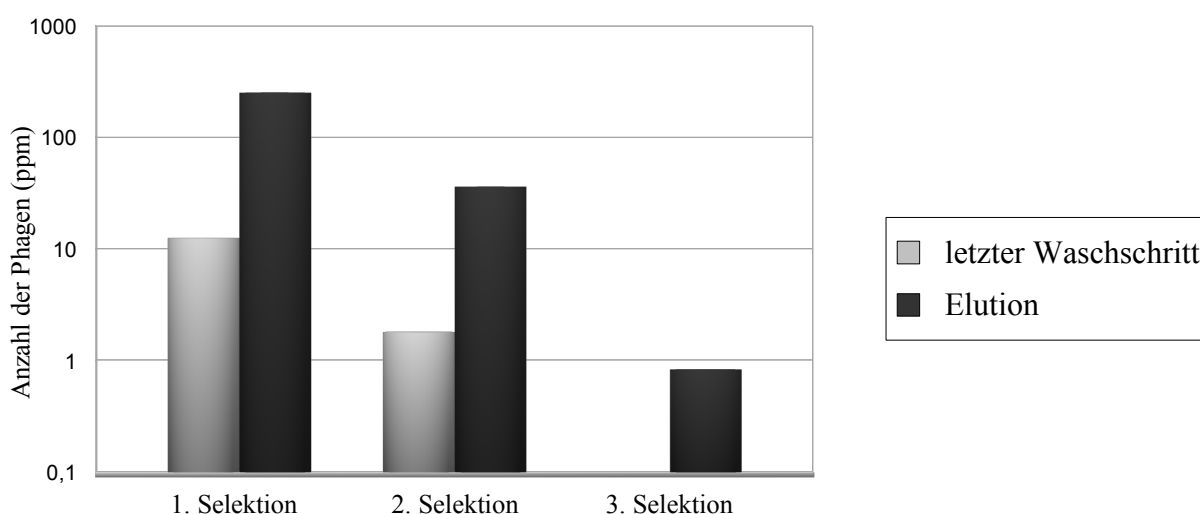


Abbildung 3.7: Titerverlauf der drei Selektionsrunden gegen AEV. Der Phagentiter für den letzten Waschschrift mit PBS sowie der sauren Elution mit Glycin HCl, pH 2,8, ist in cfu/ml in ppm bezogen auf die zum Panning eingesetzte Phagenanzahl in cfu/ml. Die y-Achse ist logarithmisch skaliert.

Zu sehen ist ein kontinuierlicher Abfall sowohl des Wasch- als auch des Elutionstiters im Verlauf der drei Selektionsrunden. Der Titer des letzten Waschschriffs liegt immer deutlich unter dem Elutionstiters.

Tab. 3.2: Absolute Werte der eingesetzten Phagen sowie der Titerbestimmungen des letzten Waschschriffs mit PBS und der Elution der drei Selektionsrunden gegen AEV.

	<i>1. Selektionsrunde</i>	<i>2. Selektionsrunde</i>	<i>3. Selektionsrunde</i>
<i>Eingesetzte Phagen</i>	1×10^{10}	5×10^{11}	1×10^{12}
<i>letzter Waschschrift</i>	$1,25 \times 10^5$	9×10^5	$5,7 \times 10^4$
<i>Elution</i>	$2,5 \times 10^6$	$1,8 \times 10^7$	$8,3 \times 10^5$

Alle Angaben in cfu.

3.5 Analysen der selektierten scFv-Phagen

3.5.1 Analysen der selektierten scFv-Phagen mittels PCR

Zur Überprüfung der Vollständigkeit des *scFv*-Gens der aus der dritten Runde selektierten scFv-Phagen wurden diese mittels Kolonie-PCR untersucht (2.2.25). Um eine ausreichende Anzahl an Klonen für weitere Analysen sicherzustellen, wurden 240 Klone der Selektion gegen VP2 und 192 Klone der Selektion gegen AEV überprüft. In der Kolonie-PCR wurden Klone aus der Elution mit Glycin/HCl, pH 2,8 der letzten Selektionsrunde mit den Primern LMB3MH_f2 (270) und fdseq-2_rev (741) bei einer Anlagerungstemperatur von 62°C eingesetzt. Ein vollständiges scFv-Gen weist dabei eine Fragmentgröße von 977 bp auf. Kleinere Fragmente entstehen, wenn es zu Deletionen im Gen gekommen ist. Bei einem vollständigen Verlust des Gens, kann keine Bande amplifiziert werden. In Abbildung 3.8 ist beispielhaft ein Ergebnis einer Kolonie-PCR zur Überprüfung der Vollständigkeit des Antikörperfragments abgebildet.

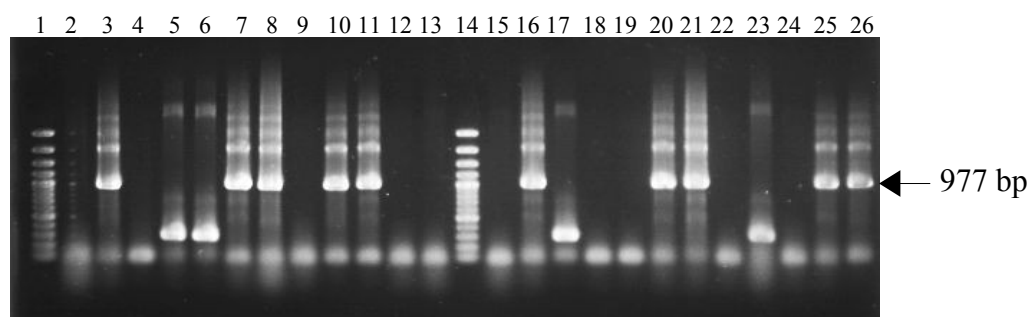


Abbildung 3.8: Kontrolle von selektierten scFv-Klonen auf Vollständigkeit des scFv-Gens. Dargestellt ist das Ergebnis einer Kolonie-PCR, welche zur Überprüfung der Vollständigkeit des Antikörperfragments durchgeführt wurde. Durch eine Amplifizierung mit den Primern LMB3MH_f2 (270) und fdseq-2_rev (741) bei einer Anlagerungstemperatur von 62°C und einer Elongationszeit von 60 s ergibt sich für ein vollständiges scFv-Fragment eine Größe von 977 bp. Aufgetragen wurden jeweils 5 µl von Marker (Bahn 1 und 14) sowie Proben (Bahn 2-13 und 15-24).

108 der 240 VP2-Klone wiesen ein vollständiges *scFv*-Gen auf, welches einem prozentualen Anteil an Vollängenklonen von 45% entspricht. Bei den gegen AEV gerichteten scFvs konnte in 104 Klonen ein vollständiges Insert nachgewiesen werden, was einem Anteil von 54 % entspricht. Eine Übersicht der PCR-Ergebnisse ist in Tab. 3.3 dargestellt.

Tab. 3.3: Übersicht der Ergebnisse der PCR-Analysen der scFv-Klone aus den Selektionen gegen AEV und VP2.

	<i>AEV</i>	<i>VP2</i>
Überprüfte Klone	192	240
Vollängenklone	104	108
Prozentualer Anteil Vollängenklone	54%	45%

Angegeben sind die absoluten Zahlen der überprüften Klone sowie die darin enthaltene Anzahl an Vollängenklonen. Zusätzlich angegeben ist der prozentuale Anteil der Vollängenklone an der Gesamtzahl der überprüften Klone.

3.5.2 Expressionsanalysen der selektierten scFv-Klone

Die ein vollständiges *scFv*-Gen aufweisenden Klone wurden anschließend hinsichtlich ihrer Expression überprüft, da es durch Deletionen und Insertionen im Gen zu

Leserasterverschiebungen und internen Stopkodons kommen kann. Hierzu wurden sie einer Analyse mittels der Deoxycholat (DOC)-Methode unterzogen (2.2.48). Als positiv wurden Klone bezeichnet, die gegenüber der Kontrollplatte ohne DOC ein sehr geringes oder gar kein Wachstum zeigten. Bei den AEV-Klonen zeigten 70 von 102 Klonen eine deutliche Expression, was einen Anteil von 68,6% ausmacht. Von den 99 untersuchten VP2-Klonen konnte bei 62 Klonen eine deutliche Expression gezeigt werden, das entspricht einem Anteil von 62,6%. Eine Übersicht der Ergebnisse zeigt Tab. 3.4.

Tab. 3.4: Übersicht der Ergebnisse des DOC-Screenings der scFv-Klone aus den Selektionen gegen AEV und VP2. Angegeben sind die absoluten Zahlen der überprüften Klone sowie die darin enthaltene Anzahl an exprimierenden Klonen. Zusätzlich aufgeführt ist der prozentuale Anteil der stark exprimierenden Klone an der Gesamtzahl der überprüften Klone.

	<i>AEV</i>	<i>VP2</i>
<i>Überprüfte Klone</i>	102	99
<i>Stark exprimierende Klone</i>	70	62
<i>Prozentualer Anteil stark exprimierender Klone</i>	69%	63%

3.5.3 Sequenzanalysen selektierter scFv-Klone

Durch die Sequenzierung zufällig ausgewählter scFv-Klone, sowohl aus dem Panning gegen AEV als auch gegen VP2, sollte eine Anreicherung identischer Klone überprüft werden. Die Sequenzierung von neun Klonen des AEV-Pannings ergab eine Sequenzübereinstimmung von drei Klonen. Dieser Klon wurde als scFv AEV5 bezeichnet. Die restlichen Klone wiesen unterschiedliche Sequenzen auf.

Die Sequenzierung von fünf Klonen der Selektion gegen VP2 ergab keine übereinstimmenden Klone. Einer der sequenzierten Klone wies ein internes Stopcodon im CDRH₃ auf, sowie eine Insertion und Deletion, welche zu einer Verschiebung des Leserasters führten.

3.5.4 Dot-Blot Analysen von scFv AEV5

Zur weiteren Charakterisierung von scFv AEV5 wurde ein Dot-Blot mit scFv AEV5 Phagen durchgeführt. Hierzu wurde eine Nitrozellulosemembran zweimal mit AEV haltigen Proben

sowie einer Negativkontrolle betropft (2.2.31.4). Nach Zugabe der Antikörper *Alkaline Phosphatase conjugated Affinity Purified Anti-mouse IgG* (Rockland) in einer Verdünnung von 1:1000, *Mab to M13* (Progen) in einer Verdünnung von 1:1000 und 10^{10} pfu scFv AEV5 konnte eine Färbung sowohl der Positiv- als auch der Negativkontrolle festgestellt werden (Abbildung 3.9).



Abbildung 3.9: Dot Blot Analyse mit scFv AEV5. Aufgetropft wurden zwei AEV-positive Proben (1 und 2) sowie eine AEV-Negativ Probe (3). Der Nachweis erfolgte mit *Alkaline Phosphatase conjugated Affinity Purified Anti-mouse IgG* (Rockland) in einer Verdünnung von 1:1000, *Mab to M13* (Progen) in einer Verdünnung von 1:1000 und 10^{10} pfu scFv AEV5.

3.5.5 Immunfärbung mit scFv AEV5

Um Kreuzreaktionen der Antikörper beim Dot-Blot ausschließen zu können, wurde zusätzlich eine Immunfärbung mit scFv AEV5 durchgeführt (2.2.31.4). 1 ml einer Negativprobe wurden mit TCA gefällt (2.2.19) und in 80 μ l PBS aufgenommen. Aufgetragen auf ein PAA-Gel mit anschließender elektrophoretischer Auftrennung und Western Blot (2.2.29 und 2.2.30) wurden 40 μ l mit SSB versetzter Probe. Zur Detektion wurden wie im Dot-Blot die drei Antikörper *Alkaline Phosphatase conjugated Affinity Purified Anti-mouse IgG* (Rockland) in einer Verdünnung von 1:1000, *Mab to M13* (Progen) in einer Verdünnung von 1:1000 und 10^{10} pfu scFv AEV5 verwendet. Es konnte eine deutliche Bande in der Negativkontrolle bei etwa 34 kDa detektiert werden (Abbildung 3.10).

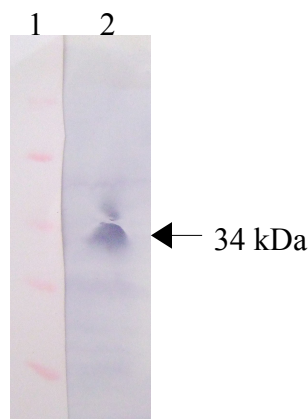


Abbildung 3.10: Immunfärbung mit scFv AEV5. 40 µl Negativkontrolle (2) wurden in einem 12% Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Der Nachweis erfolgte mit *Alkaline Phosphatase conjugated Affinity Purified Anti-mouse IgG* (Rockland) in einer Verdünnung von 1:1000, *Mab to M13* (Progen) in einer Verdünnung von 1:1000 und 10^{10} pfu scFv AEV5.

Da der scFv AEV5 deutlich mit der Negativkontrolle reagierte, wurden weitere Arbeiten an diesem Klon eingestellt.

3.5.6 ELISA mit gegen VP2 selektierten scFv-Klonen

Zur weiteren Charakterisierung der aus dem VP2-Panning erhaltenen Klone wurde ein ELISA durchgeführt. Hierzu wurden zunächst lösliche scFvs in Mikrotiterplatten produziert (2.2.39). Diese wurden dann in einem ELISA eingesetzt, in dem der AEV-Impfstoff der Firma LAH als Antigen eingesetzt wurde (2.2.40). Die Bindungsstärke wurde durch eine quantifizierbare Farbreaktion bestimmt. Durch die Verwendung des kompletten Viruspartikel als Antigen sollten vorzugsweise gegen VP2 gerichteten Klone identifiziert werden, deren Epitop auf der Oberfläche des Virus lokalisiert ist.

Durchgeführt wurden die Messungen als Doppelbestimmungen. In Tab. 3.5 sind die Ergebnisse der Klone gezeigt, für die im Anschluss SPR-Messungen durchgeführt wurden. Gemessen wurden insgesamt 38 Klone.

Tab. 3.5: Ergebnisse des ELISA der Klone aus dem gegen VP2 durchgeführten Panning, die für weitere Arbeiten ausgewählt wurden.

<i>Klon</i>	<i>Absorption 1. Messung</i>	<i>Absorption 2. Messung</i>
Nullwert	0,112	0,123
ScFv VP2 20	0,275	0,402
Scfv VP2 21	0,200	0,183
ScFv VP2 25	0,232	0,219
ScFv VP2 26	0,184	0,159
ScFv VP2 28	0,165	0,115

Angegeben sind die Messwerte bei 405 nm.

3.6 Aufreinigung der scFvs

Die Aufreinigung der scFvs erfolgte chromatographisch mittels einer Protein A-Säule an der ÄKTAprime™ plus (GE Healthcare). Die stufenlose Elution der gebundenen scFvs von der Säule erfolgte sauer mit Glycin/HCl bei einem pH von 2,8 (2.2.33). In Abbildung 3.11 ist exemplarisch der Verlauf der Elution des scFv VP2 20 gezeigt.

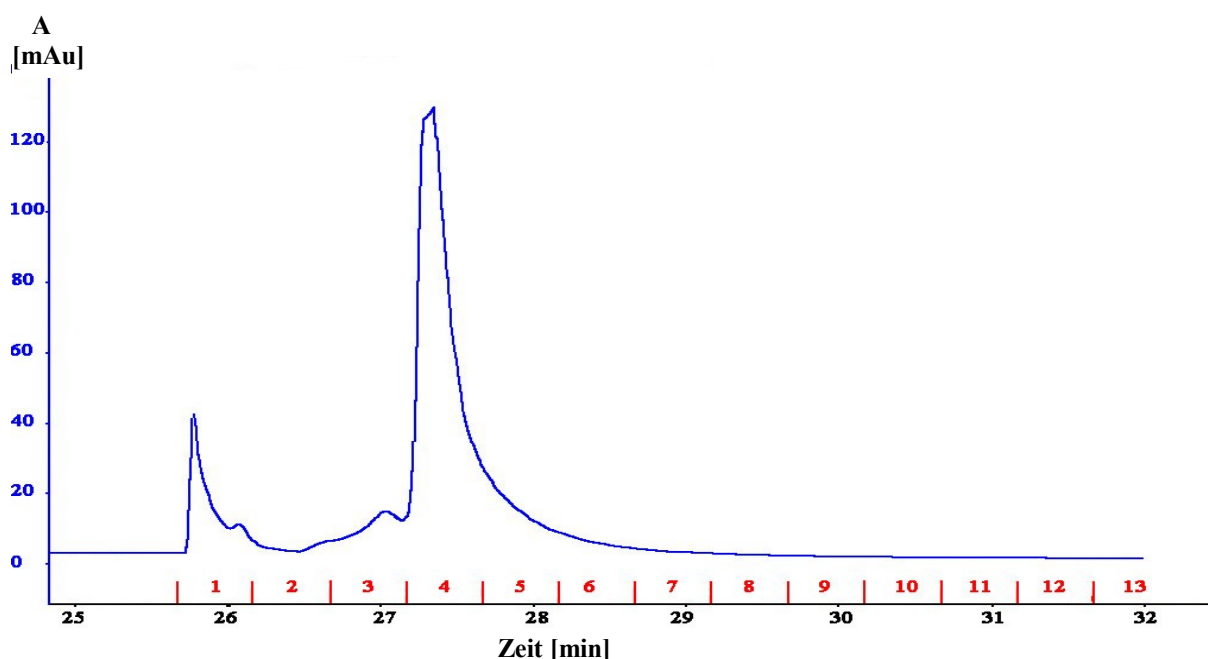


Abbildung 3.11: Verlaufsprotokoll der Aufreinigung von scFv VP2 20 über eine Protein A Säule an der ÄKTAprime™ plus. Dargestellt ist der Verlauf der UV-Absorption bei 280 nm (blaue Linie). Die Elution erfolgte mit Glycin/HCl, pH 8 mit einer Fraktionsgröße von 0,5 ml. Die Neutralisierung der Eluatfraktionen wurde mit 50 µl 1 M Tris, pH 9 durchgeführt. Die Absorption bei 280 nm in mAu ist über der Zeit in min aufgetragen. Zusätzlich sind auf der x-Achse die Eluatfraktionen (rot) angegeben.

Die Absorption des Eluats bei 280 nm zeigte einen Peak in den Elutionsfraktionen 3-7. Zur Überprüfung der Aufreinigung des scFv wurde eine SDS-PAGE (2.2.29) mit anschließender Silberfärbung (2.2.31.2) der Proteine durchgeführt. Hierzu wurden zusätzlich zu den Eluatfraktionen der Chromatographie Proben einer *E. coli* TB1-Expressionskultur von scFv VP2 20 zum Zeitpunkt vor der Induktion sowie direkt vor dem Säulenlauf genommen. Jeweils 450 µl aller Proben wurden mit TCA gefällt (2.2.19), in 50 µl 1x SSB Puffer aufgenommen und auf eine SDS-PAGE aufgetragen (Abbildung 3.12)..

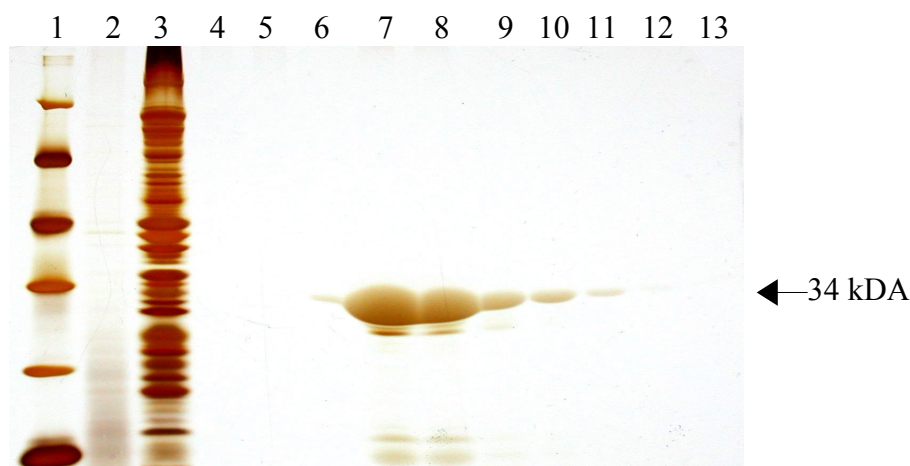


Abbildung 3.12: Proben der Expressionskultur und Eluatfraktionen der Aufreinigung von scFv VP2 20 über eine Protein A Säule an der ÄKTaprime™ plus, aufgetrennt auf einem Polyacrylamidgel (12%) und anschließend mit Silber angefärbt. Aufgetragen wurden 10 µl Marker (Bahn 1) und je 15 µl Proben (Bahn 2: Expressionskultur vor der Induktion; Bahn 3: Expressionskultur direkt vor dem Säulenlauf; Bahn 4-13: Eluatfraktionen 1-10 des Säulenlaufs von scFv VP2 20)

Deutlich ist in den Eluatfraktionen 4 bis 8 eine Bande bei 34 kDa zu erkennen, die der Größe des scFv entspricht. Entsprechend dem Peak im Elutionsprotokoll der ÄKTaprime™ plus ist die größte Anreicherung in Fraktion 4 zu finden. Die Probe der Expressionskultur, welche vor der Induktion mit IPTG genommen wurde, zeigt nur einen geringen Proteinanteil, der in der Probe der Kultur direkt vor dem Säulenlauf deutlich stärker ist. Um zu verifizieren, ob es sich bei dem 34 kDa großen Protein um den scFv handelte, wurde eine Immunfärbung (2.2.31.4) mit den gleichen Proben durchgeführt. Aufgrund der c-terminalen flag-Sequenz im Phagemid ist ein Nachweis mit einem anti-flag Antikörper möglich, dem *Flag peptide, mouse antibody* (Novitek). Als sekundärer Antikörper wurde der *Alkaline Phosphatase conjugated Affinity Purified Anti-mouse IgG (H&L)* (Rockland) verwendet. Das Ergebnis der Immunfärbung ist in Abbildung 3.13 zu sehen. Deutlich zu erkennen sind die Banden des Antikörperfragments in

den Eluatfraktionen 3 bis 9 sowie in der Probe der Expressionskultur vor der Säule. Die Banden im mit Silber angefärbten SDS-Gel bei 34 kDa können somit dem scFv zugeordnet werden.

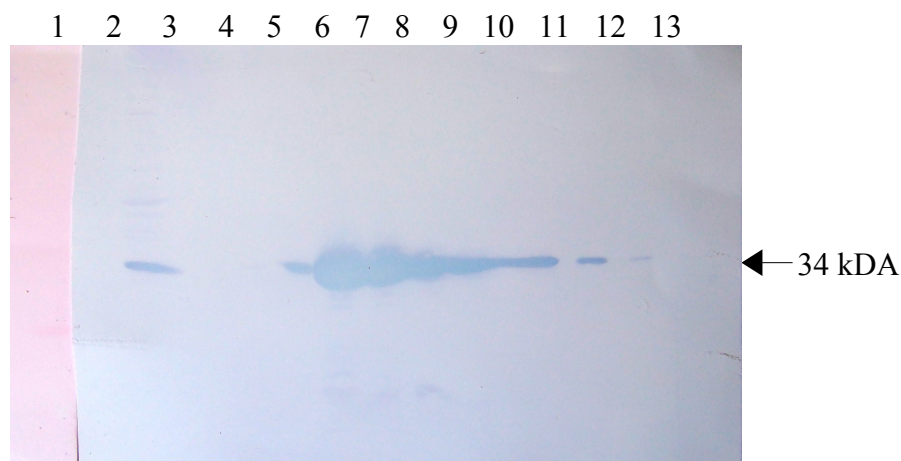


Abbildung 3.13: Proben der Expressionskultur und Eluatfraktionen der Aufreinigung von scFv VP2 20 über eine Protein A Säule an der ÄKTApriTM plus, aufgetrennt auf einem Polyacryamidgel (12%) und anschließend immungefärbt mit dem *Flag peptide, mouse antibody* (Novitek) in einer Verdünnung von 1:2 000 und dem *Alkaline Phosphatase conjugated Affinity Purified Anti-mouse IgG (H&L)* (Rockland) in einer Verdünnung von 1:1 000. Aufgetragen wurden 10 µl Marker (Bahn 1) und je 15 µl Proben (Bahn 2: Expressionskultur vor der Induktion; Bahn 3 Expressionskultur direkt vor dem Säulenlauf; Bahn 4-13: Eluatfraktionen 1-10 des Säulenlaufs von scFv VP2 20).

Die Fraktionen 3 bis 7 wurden vereinigt und in 1x PBS, pH 7,4 umgepuffert (2.2.35). Für die anschließenden Messungen wurde die Proteinkonzentration bestimmt (2.2.37).

Parallel wurde eine Aufreinigung der Antikörperfragmente aus dem Überstand einer Expressionskultur mittels einer *HisTrapTM FF crude*-Säule (GE Healthcare) durchgeführt (2.2.34). Die Elution erfolgte über einen kontinuierlichen Imidazolgradienten. Das Verlaufsprotokoll zeigte einen Anstieg der Absorption bei 280 nm ab Eluatfraktion 5 (Abbildung 3.14).

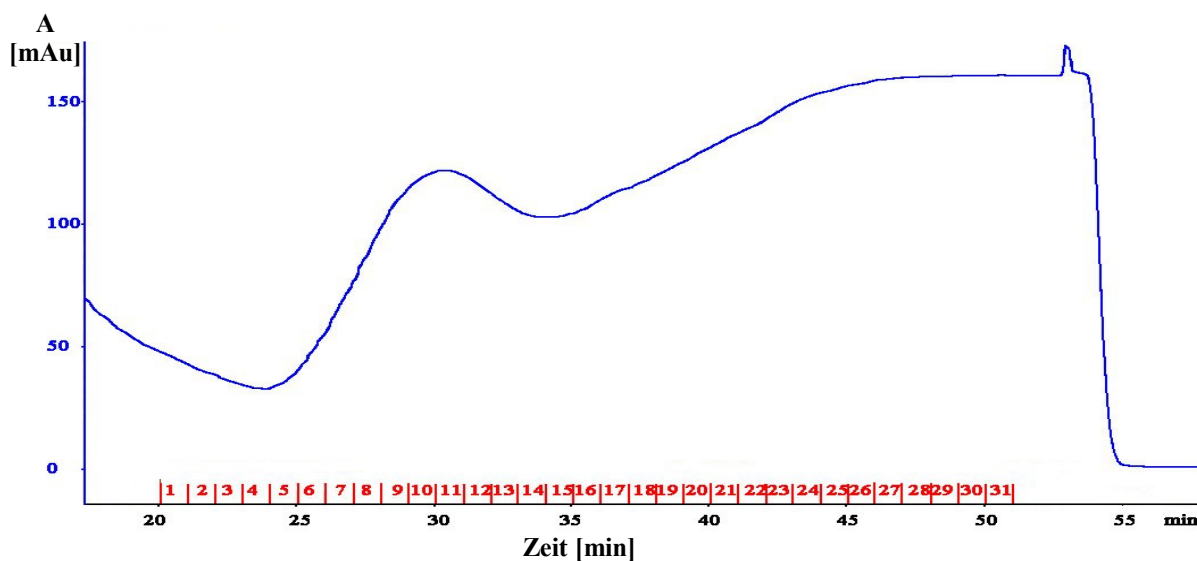


Abbildung 3.14: Verlaufsprotokoll der Aufreinigung von scFv VP2 20 über eine HisTag- Säule an der ÄKTaprime™ plus. Dargestellt ist der Verlauf der UV-Absorption bei 280 nm (blaue Linie). Die Elution erfolgte mit einem kontinuierlichen Imidazolgradienten mit einer Fraktionsgröße von 1 ml. Die Absorption bei 280 nm in mAu ist über der Zeit in min aufgetragen. Zusätzlich sind die Eluatfraktionen (rot) auf der x-Achse aufgetragen.

Ein Anstieg ist in den Fraktionen 5 bis 15 zu erkennen, allerdings fällt die Absorption nicht wieder ab, sondern steigt kontinuierlich weiter an.

Zur Überprüfung der Aufreinigung wurde eine SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung der Proteine mit ausgewählten Eluatfraktionen durchgeführt (Abbildung 3.15). Die Eluatfraktionen wurden komplett mit TCA gefällt (2.2.19) und in 35 µl SSB aufgenommen.

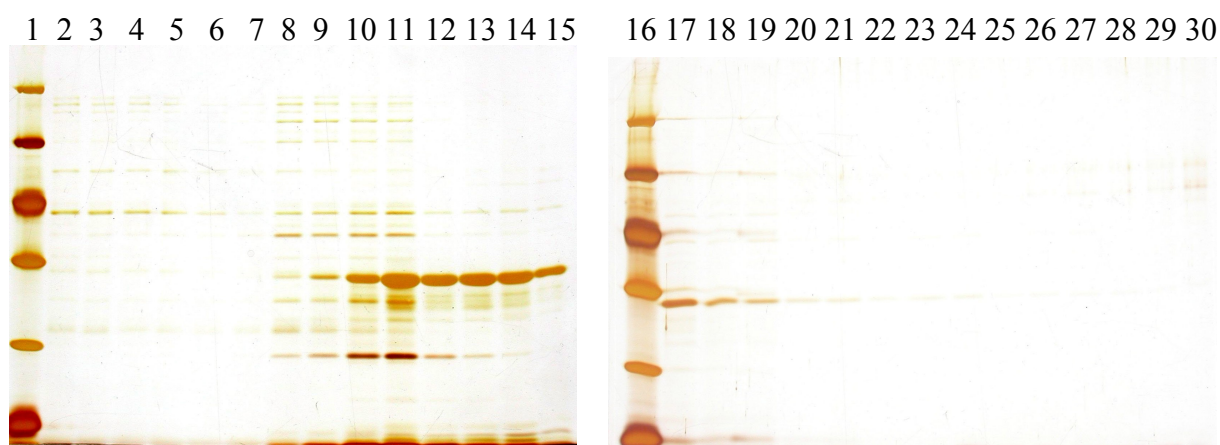


Abbildung 3.15: Proben der Eluatfraktionen der Aufreinigung von scFv VP2 20 über eine HisTrap™ FF crude-Säule (GE Healthcare) an der ÄKTaprime™ plus, aufgetrennt auf zwei PAA-Gelen (12%) und anschließend mit Silber angefärbt. Aufgetragen wurden 10 µl Marker (Bahn 1 und 16) und je 15 µl Proben (Bahn 2-15: Eluatfraktionen 1-14; Bahn 17-30: Eluatfraktionen 15-16; 18-20; 22; 23; 25-30; 32)

Deutlich ist eine dem scFv entsprechende Bande bei 34 kDa in den Eluatfraktion 7 bis 19 zu erkennen. Die größte Ausbeute zeigen die Fraktionen 9 bis 13. Zusätzlich zu den scFv-Banden sind zahlreiche zusätzliche Banden zu sehen, die Verunreinigungen darstellen. Aufgrund dieser Verunreinigungen wurden für die weiteren Analysen nur über Protein A aufgereinigte Klone verwendet.

3.7 Immunfärbung mit scFv VP2 20

Um eine Bindung von scFv VP2 20 an das Virushüllprotein VP2 zu bestätigen, wurde eine Immunfärbung durchgeführt. Hierzu wurden 630 µl VP2 Rohextrakt mit TCA gefällt (2.2.19), in 80 µl 1x SSB aufgenommen und davon 22,5 µl über eine SDS-Gelelektrophorese (2.2.29) aufgetrennt. Als primärer Antikörper in der an den Western-Blot (2.2.30) anschließenden Immunfärbung (2.2.31.4) diente der scFv VP2 20. Dieser wurde in einer Konzentration von 500 nM eingesetzt. Als sekundärer und tertiärer Antikörper dienten der *Flag peptide, mouse antibody* (Novitek) in einer Verdünnung von 1:2 000 sowie der *Alkaline Phosphatase conjugated Affinity Purified Anti-mouse IgG (H&L)* (Rockland) in einer Verdünnung von 1:1 000.

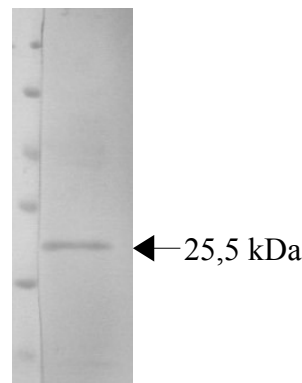


Abbildung 3.16: Immunfärbung des Phagenhüllproteins VP2 mit scFv VP2 20. Auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen wurden 22,5 µl von 630 µl gefällten VP2 Rohextrakts, welcher in 80 µl 1 SSB aufgenommen wurde. Die an den Western Blot anschließende Immunfärbung erfolgte mit 500 nm scFv VP2 20 und dem *Flag peptide, mouse antibody* in einer Verdünnung von 1:2 000 sowie dem *Alkaline Phosphatase conjugated Affinity Purified Anti-mouse IgG (H&L)* in einer Verdünnung von 1:1 000.

Deutlich ist die dem VP2-Protein entsprechende Bande bei 25,5 kDa zu erkennen. Eine Bindung des scFv VP2 20 an das Phagenhüllprotein konnte somit bestätigt werden.

3.8 ELISA mit scFv VP2 20

Zur Überprüfung der Bindung von scFv VP2 20 wurde ein erneuter ELISA durchgeführt (2.2.40), da dies auch die finale Applikation darstellt. Als Antigen wurde sowohl aufgereinigtes VP2-Protein als auch Viruspartikel eingesetzt. Der aufgereinigte scFv VP2 20 wurde in einer Konzentration von 2,5 μ M eingesetzt. Als sekundärer und tertiärer Antikörper wurden der *Flag peptide*, *mouse antibody* und der *Alkaline Phosphatase conjugated Affinity Purified Anti-mouse IgG (H&L)* verwendet. Zusätzlich wurden Kontrollen mit PBS durchgeführt. In Tab. 3.6 ist die Belegung des ELISA aufgeführt. Die Ergebnisse sind in Tab. 3.7 dargestellt.

Tab. 3.6: ELISA mit scFv VP2 20 und Kontrollen.

A	Virus	Blockierungslsg.	ScFv VP2 20	2. + 3. Ak	Substrat
B	Virus	Blockierungslsg.	ScFv VP2 20	2. + 3. Ak	Substrat
C	VP2	Blockierungslsg.	ScFv VP2 20	2. + 3. Ak	Substrat
D	VP2	Blockierungslsg.	ScFv VP2 20	2. + 3. Ak	Substrat
E	PBS	Blockierungslsg.	ScFv VP2 20	2. + 3. Ak	Substrat
F	PBS	Blockierungslsg.	ScFv VP2 20	2. + 3. Ak	Substrat
G	PBS	Blockierungslsg.	PBS	2. + 3. Ak	Substrat
H	PBS	Blockierungslsg.	PBS	2. + 3. Ak	Substrat

Von links nach rechts sind die für die Vertiefung eingesetzten Lösungen und Substanzen angegeben.

Tab. 3.7: Ergebnisse des ELISA mit scFv VP2 20 und Kontrollen.

Vertiefung	Absorption
A	0,626
B	0,515
C	0,816
D	0,514
E	0,071
F	0,177
G	0,048
H	0,057

Angegeben sind die Messwerte bei 405 nm.

Zu erkennen ist eine deutliche Bindung des scFv VP2 20 an VP2 als auch an die Viruspartikel. Sehr deutlich wird der Unterschied zu den Messungen ohne Antigen ab der Messung nach 40 min. Ohne Antigen kann kein spezifisches Signal festgestellt werden.

3.9 Charakterisierung der scFvs mittels Oberflächenplasmonresonanz

Für die Charakterisierung der scFvs hinsichtlich ihrer Affinität erfolgte eine Analyse mittels Oberflächenplasmonresonanz an der Autolab Esprit (Eco Chemie) (2.2.49).

Für die Untersuchungen wurden unbeschichtete Goldchips der Firma Xantec verwendet, welche mit einer Thioloberfläche versehen wurden, an die eine kovalente Kopplung der Viruspartikel erfolgte (2.2.49.1).

Die Messungen erfolgten simultan in beiden Küvetten. Hierbei wurde eine Küvette mit der Antikörperlösung beschickt, die andere diente als Referenz, in der ausschließlich Bindungspuffer eingesetzt wurde. Die aus der Referenzküvette gemessenen Werte wurden von den Messwerten der Antikörperlösung abgezogen, um unspezifische Bindungen aus den Ergebnissen zu eliminieren.

3.9.1 Kopplung der Viruspartikel

Die Grundlage der Oberflächenplasmonresonanzanalysen liegt in der Immobilisierung eines Liganden an den Sensorchip. Hier wurden AE Viruspartikel über eine kovalente Bindung der aktivierten Carboxymethyl-Gruppen an die primären Amine des Proteins an den Chip gekoppelt (2.2.49.1). Das Sensorgramm einer Kopplung von AEV Partikeln an den Sensorchip ist in Abbildung 3.17 zu sehen.

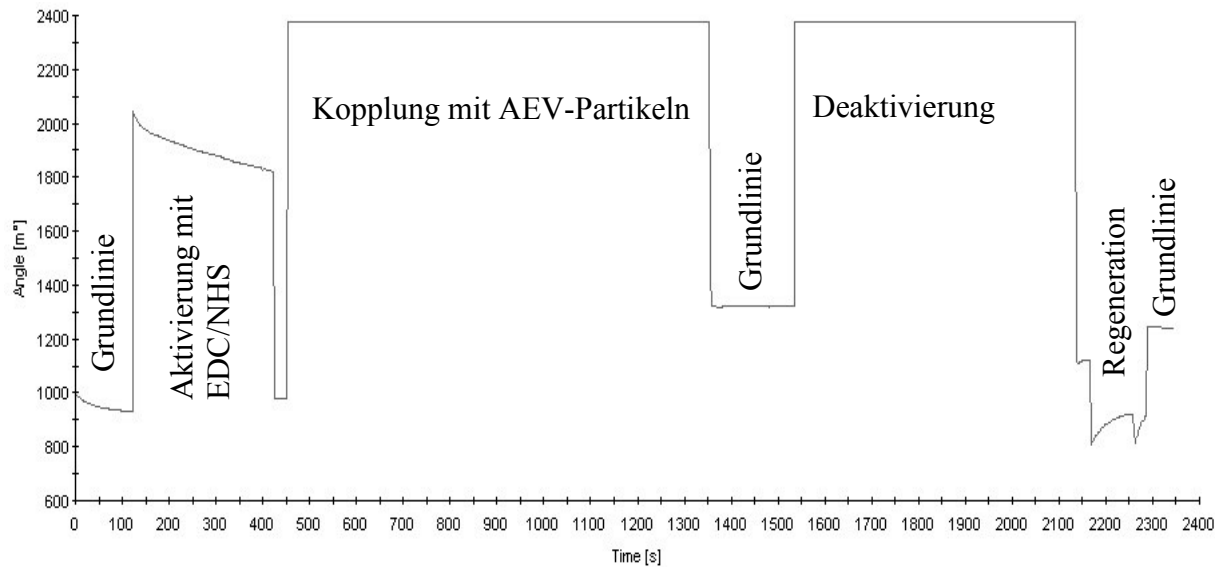


Abbildung 3.17: Sensorgramm der Immobilisierung von AEV Partikeln an die SPR Sensordisc Au über eine kovalente Kopplung. Zu sehen ist das Sensorgramm der Kopplungssequenz: 120 s Grundlinie; 300 s Aktivierung der Oberfläche mit EDC/NHS; 900 s Kopplung von AEV Partikeln; 600 s Deaktivierung der freien Bindestellen mit Ethanolamin; 120 s Regeneration mit 0,1 M HCl. Der Winkel („angle“) in m° ist über der Zeit (time) in s aufgetragen.

Zu erkennen ist ein Anstieg der Grundlinie. Dies zeichnet eine erfolgreiche Kopplung aus, da ein linearer Zusammenhang zwischen der an der Chipoberfläche gebundene Masse und der Änderung des SPR Winkels besteht. Als Bezugspunkte dienen hier die Höhe der Grundlinie vor der Injektion des Liganden und die Höhe am Ende der Immobilisierungssequenz. Hier ist ein Anstieg von $980 m^\circ$ auf $1250 m^\circ$, insgesamt also 270 m zu verzeichnen.

3.9.2 Affinitätsbestimmung ausgewählter scFvs

Die Affinität der aufgereinigten scFvs wurde mittels Oberflächenplasmonresonanzanalyse an der Autolab Esprit (Eco Chemie) gemessen (2.2.49). Hierzu wurde die Oberfläche des Sensorchips in beiden Küvetten mit AEV Partikeln gekoppelt (2.2.49.1) und anschließend die Messungen mit den Antikörperfragmenten durchgeführt. Gemessen wurden mindestens 2 verschiedene Konzentrationen des scFv. Um noch an das Virus gebundene scFvs vollständig zu entfernen wurde eine Regeneration mit 0,1 M Glycin/HCl, pH 2,8 durchgeführt. Dies ermöglichte die Durchführung mehrerer Messungen an einem Sensorchip.

3.9.2.1 Affinitätsbestimmung von scFv VP2 20

Die Affinität des scFv VP2 20 wurde in den Konzentrationen 2,5 μM , 3,5 μM und 5 μM bestimmt (Abbildung 3.18).

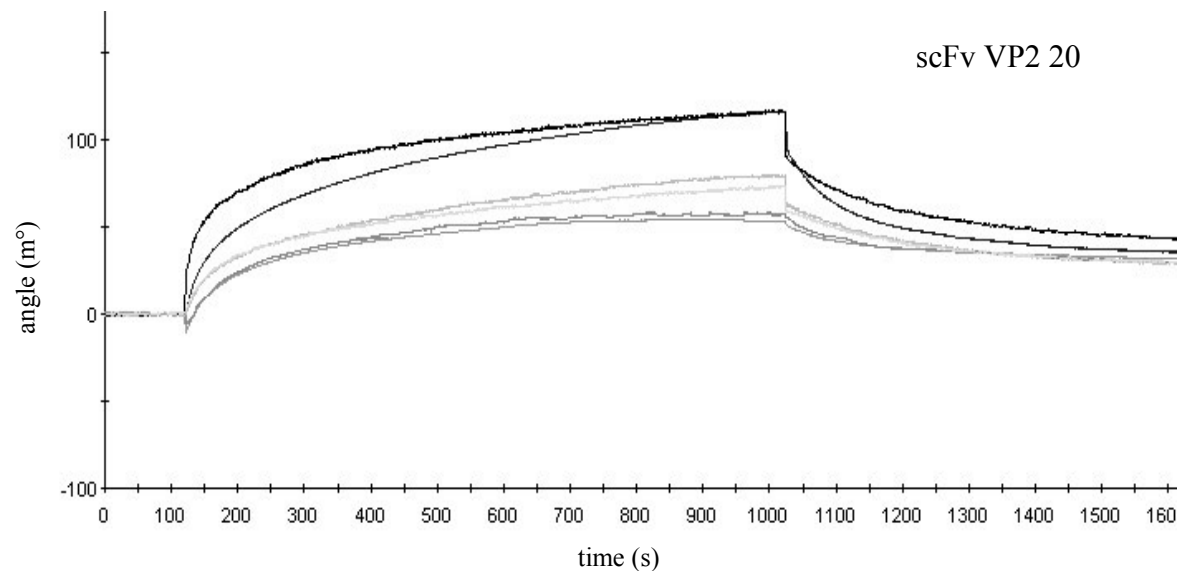


Abbildung 3.18: Affinitätsbestimmung des scFv VP2 20 zum AEV. Eingesetzt wurden verschiedene Antikörperkonzentrationen (2,5 μM , 3,5 μM , 5 μM). Diese wurden auf einem mit AEV-Partikeln gekoppelten Chip eingesetzt und das Bindungsverhalten analysiert. Der Winkel („angle“) in m° ist über die Zeit in s angegeben.

Nach Aufgabe der Probenlösung bei 120 s steigt die Kurve bei allen Konzentrationen zunächst an. Bei den höheren Konzentrationen kommt es bei der Assoziation zu keiner Einstellung des Gleichgewichts (die Anzahl der bindenden Fragmente entspricht der der Dissoziierenden), dies ist nur bei der Konzentration von 2,5 μM zu beobachten. Der maximal Anstieg bei der Konzentration von 5 μM beträgt 130 m° . Der zu Beginn ungleiche Verlauf der Kurven mit der Konzentration von 5 μM ist vermutlich systembedingt durch Puffer- oder Temperatureffekte. Die Dissoziation verläuft in Richtung eines Gleichgewichtszustands. Für den scFv VP2 20 konnte eine Affinität von 5,27 μM berechnet werden.

3.9.2.2 Affinitätsbestimmung von scFv VP2 21, 25, 26 und 28

Für die Affinitätsmessungen von scFv VP2 21, 25, 26 und 28 wurden die Konzentrationen 5 μM und 2 μM verwendet. Das Messergebnis von scFv VP2 25 ist in Abbildung 3.19 zu

sehen.

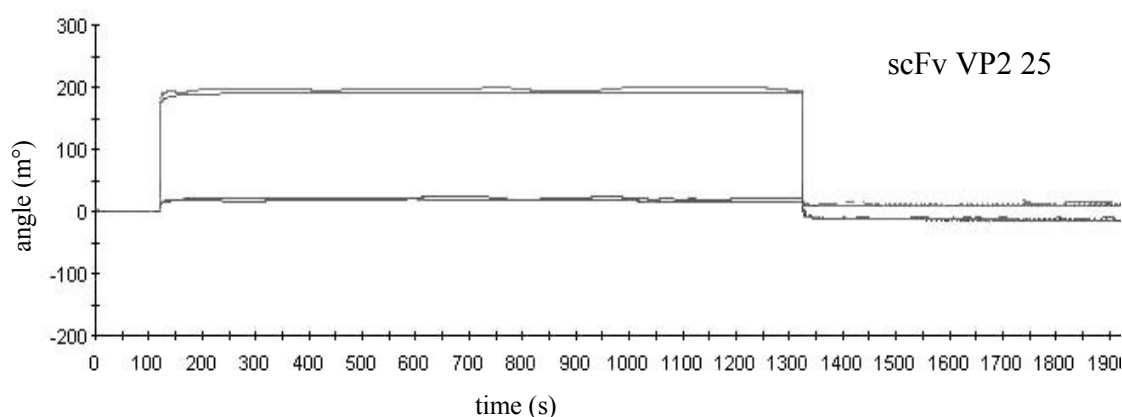


Abbildung 3.19: Affinitätsbestimmung des scFv VP2 25 zum AEV. Eingesetzt wurden verschiedene Antikörperkonzentrationen (2 μ M und 5 μ M). Diese wurden auf einem mit AEV-Partikeln gekoppelten Chip eingesetzt und das Bindungsverhalten analysiert. Der Winkel („angle“) in m° ist über die Zeit („time“) in s angegeben.

Es konnte für den scFv VP2 25 keine Dissoziationskonstante berechnet werden, da keine Bindung beobachtet werden konnte. Der starke Anstieg zu Beginn ist auf die Änderung des Refraktionsindex zurückzuführen, steht aber nicht in Verbindung mit einer Massenänderung auf der Chipoberfläche. Auch für scFv VP2 21, 26 und 28 konnte keine Dissoziationskonstante berechnet werden.

3.10 Konstruktion des binären Vektors *pcIPG+35S*

Für die Expression des rekombinanten Antikörperfragments scFv VP2 20 in *Nicotiana tabacum* wurde das Fragment mit den Primern scFv_VP2_20 s (999) und scFv_VP2_20 r (1000) amplifiziert und über die Restriktionsschnittstellen *ClaI* und *HindIII* in den binären Vektor *pcIPG+35S* (2.1.11) zur Konstruktion von *pcIPG+35S+scFv VP2 20* kloniert (Abbildung 3.20). Das Konstrukt wurde für die *A. tumefaciens* vermittelte Transformation von *N. tabacum* eingesetzt (2.2.13 und 2.2.14).

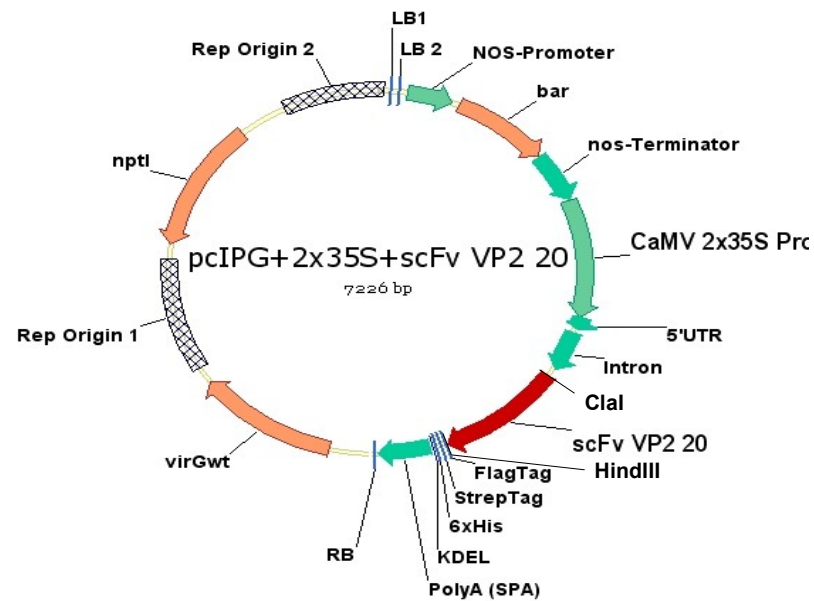


Abbildung 3.20: Vektorkarte von pcIPG+2x35S+scFv VP2 20. Das Antikörperfragment scFv VP2 20 wurde über die Restriktionsschnittstellen *Clal* und *HindIII* in den binären Vektor kloniert und liegt unter der Kontrolle des CaMV 2x35S Promoters.

3.11 Stabile Transformation von *N. tabacum*

Die Transformation von *N. tabacum* mit dem Konstrukt pcIPG+35S+scFv VP2 20 (3.10) wurde mittels *A. tumefaciens* durchgeführt. Die Regeneration transformierter Explantate erfolgte auf MSZ-Medium, wobei mittels steigender Konzentrationen von Phosphinotricin im Medium auf transgene Zellen selektiert wurde (2.2.14). In Tab. 3.8 sind die Transformationen mit dem Konstrukt pcIPG+35S+scFv VP2 20 und dem entsprechenden Transformationsweg aufgeführt.

Tab. 3.8: Transformationen von *N. tabacum* mit pcIPG+35S+scFv VP2 20. Angegeben ist die Anzahl der bei der zugehörigen Transformation verwendeten Blattexplantate, der durchgeführte Regenerationsweg für die Transformation, die Anzahl der insgesamt aus der Transformation erzeugten Sprosse und die Anzahl unabhängiger transgener Linien .

Transformations nummer	Verwendete Blattexplantate	Regenerationsweg	Erzeugte Sprosse	Transgene Linien
15/08	289	I	0	0
20/08	229	II	6	1
2/09	225	I	0	0
3/09	263	I	36	6
4/09	364	I	54	8
5/09	223	I	9	2

3.11.1 Analysen von *N. tabacum* mittels Multiplex-PCR

Zur Überprüfung der Integration des Antikörperfragments scFv VP2 20 in das Genom von *N. tabacum* wurde eine Multiplex-PCR durchgeführt (2.2.26). Hierzu wurde aus den einzelnen putativ transgenen Sprossen DNA isoliert (2.2.15) und in einer PCR mit drei verschiedenen Primerpaaren eingesetzt (2.2.26). Zur Kontrolle der DNA-Isolation wurde das Primerpaar Tef1Tabak_s (946)/ Tef1Tabak_r (947) verwendet. Dieses amplifiziert auf DNA-Ebene ein 840 bp großes Fragment des Transkriptionelongationsfaktors (TEF) 1-alpha von *N. tabacum*. Der Nachweis durch eventuell verunreinigende Agrobakterien erfolgte mittels des Primerpaares Agro_picA_for (972)/ Agro_picA_rev (973). Dieses amplifiziert ein 550 bp großes Fragment des Agrobakteriumgenoms. Zum Nachweis der Integration des scFv wurden die Primer scFv_multipl_for (970) und scFv_multipl_rev (971) verwendet, die ein 377 bp großes Stück des Antikörperfragments amplifizieren.

Für die Negativkontrolle wurde DNA einer nicht transgenen Tabakpflanze sowie eine Wasserkontrolle verwendet. Als Positivkontrollen dienten zum einen 1 µl isoliertes Plasmid des Klons scFv VP2 20 sowie 1 µl einer Agrobakteriensuspension. Ein beispielhaftes Ergebnis einer Multiplex-PCR ist in Abbildung 3.21 zu sehen.

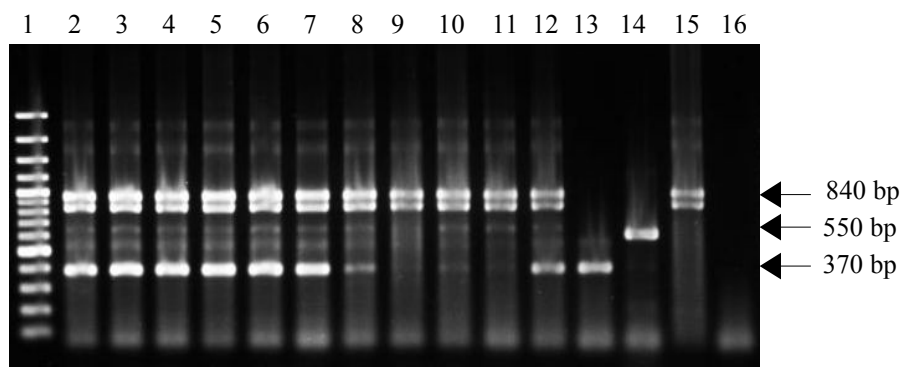


Abbildung 3.21: Kontrolle von putativ transgenen Pflanzen auf Integration des Antikörperfragments scFv VP2 20 mittels Multiplex-PCR. Beispielhaft dargestellt ist das Ergebnis einer Multiplex-PCR, welche zur Überprüfung der Integration des Antikörperfragments durchgeführt wurde. Verwendet wurden die Primerpaare Tef1Tabak_s (946)/ Tef1Tabak_r (947), Agro_picA_for (972)/ Agro_picA_rev (973) und scFv_multipl_for (970)/ scFv_multipl_rev (971) nach dem Protokoll der Multiplex-PCR (2.2.26). Aufgetragen wurden jeweils 5 µl Marker (Bahn 1), Proben putativ transgener Sprosse der Transformation 4/09 (Bahn 2-6: 1.1-1.5; Bahn 7: 1.10; Bahn 8-12: 2.1-2.5), Positivkontrolle Plasmid (Bahn 13), Positivkontrolle Agrobakterien (Bahn 14), Negativkontrolle einer nicht transgenen Pflanze (Bahn 15) sowie eine Wasserkontrolle (Bahn 16).

Sehr deutlich ist die jeweilige Bande des TEF1-Fragments bei 840 bp in den pflanzlichen Isolaten zu erkennen. In den Kontrollen mit Plasmid, Agrobakterien bzw. H₂O als Vorlage fehlt diese Bande wie erwartet. Eine Bande bei 550 bp für den Nachweis von Agrobakterien ist nur in der entsprechenden Positivkontrolle zu finden und zeigt, dass die aus *N. tabacum* isolierte DNA nicht mit Agrobakterien verunreinigt ist und somit nicht zu falsch positiven Ergebnissen führt. Der Nachweis der Integration des Antikörperfragments wird über die dem scFv-Fragment entsprechende Bande bei 370 bp geführt, dies entspricht in Abbildung 3.21 den Pflanzen 4/09 1.1; 1.2; 1.3; 1.4; 1.5; 1.10 und 2.5. Insgesamt konnten in 26 der 47 getesteten Pflanzen eine Integration in das Genom nachgewiesen werden.

In Tab. 3.9 ist eine Übersicht der Multiplex-PCR-Ergebnisse der einzelnen Transformationen dargestellt. Es wurden zumeist mehrere Klone, die aus einem Blattstück hervorgegangen waren und somit einer transgenen Linie entsprachen, getestet.

Tab. 3.9: Ergebnisse der Multiplex-PCR mit putativ transgenen Sprossen. Angegeben ist die Gesamtzahl der überprüften Klone der jeweiligen Transformationen, die darin enthaltene Anzahl positiver Klone sowie die Anzahl positiv auf persistierende Agrobakterien getesteter Sprosse.

<i>Transformationsnr.</i>	<i>Anzahl getesteter Sprosse</i>	<i>Positiv</i>	<i>Persistierende Agrobakterien</i>
15/08	0*	0	0
20/08	1	1	0
2/09	0*	0	0
3/09	2	1	0
4/09	36	16	0
5/09	8	8	0

* aus diesen Transformationen konnten keine Klone regeneriert werden

3.11.2 Expressionsanalysen von *N. tabacum* auf Transkriptionsebene

Für die Überprüfung der Expression des Antikörperfragments scFv VP2 20 in *N. tabacum* wurde eine RT-Multiplex-PCR durchgeführt. Hierzu wurde zunächst die Gesamt-RNA der transgenen Pflanzen isoliert (2.2.16) und in cDNA umgeschrieben (2.2.23). Im Anschluss wurde die cDNA in einer Multiplex-PCR eingesetzt. Der Nachweis der Transkription von scFv VP2 20 erfolgte mittels des Primerpaares scFv_multipl_for (970)/ scFv_multipl_rev (971), welches ein Amplifikat von 377 bp erzeugt. Für die Kontrolle der erfolgreichen RNA-Isolation sowie reversen Transkription wurden die Primer TeflTabak_s (946) und TeflTabak_r (947) eingesetzt. Zusätzlich ermöglicht dieses Primerpaar den Nachweis von DNA-Kontaminationen, welche als Vorlage in der PCR fungieren könnten und somit zu falsch positiven Ergebnissen führen könnten. Da der durch das Primerpaar amplifizierte Bereich ein Intron beinhaltet, ist das Amplifikat auf RNA-Ebene mit 740 bp kleiner als auf DNA-Ebene mit 840 bp. Als Negativkontrolle dienten die RNA einer nicht transgenen Pflanze sowie eine Wasserkontrolle (Abbildung 3.22).

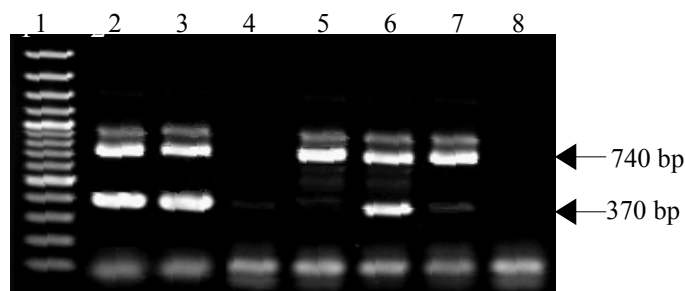


Abbildung 3.22: Analyse der Transkription des Antikörperfragments scFv VP2 20. Dargestellt ist das Ergebnis der Multiplex-RT-PCR, welches zur Überprüfung der Transkription des Antikörperfragments scFv VP2 20 diente. Verwendet wurden die Primerpaare Tef1Tabak_s (946)/ Tef1Tabak_r (947) und scFv_multipl_for (970)/ scFv_multipl_rev (971) nach dem Protokoll der Multiplex-RT-PCR (2.2.27). Aufgetragen wurden 5 µl Marker (Bahn 1), Proben putativ transgener Pflanzen (Bahn 2: 3/09 1; Bahn 3: 4/09 1.1; Bahn 4: 4/09 1.5; Bahn 5: 4/09 3.1; Bahn 6: 4/09 1.10), Negativkontrolle einer nicht transgenen Pflanze (Bahn 7) und eine Wasserkontrolle (Bahn 8).

Deutlich zu erkennen ist in der nicht transgenen Kontrollpflanze die Bande bei 740 bp, die das TEF-Fragment auf mRNA-Ebene darstellt. Eine Amplifizierung des 370 bp großen scFv-Fragments erfolgte wie erwartet nicht. Bis auf Pflanze 4/09 1.5 zeigen alle Pflanzen eine deutlich TEF-spezifische Bande. Die fehlende Bande bei Pflanze 4/09 1.5 zeigt an, dass dort keine RNA isoliert wurde. Das 370 bp große Fragment entspricht dem Antikörperfragment und konnte in den Pflanzen 3/09 1, 4/09 1.1 und 4/09 1.10 nachgewiesen werden. Die Nullkontrolle zeigt keine Banden.

Um den Ausschluss von DNA-Kontaminationen sicherzustellen, wurde die isolierte Pflanzen-RNA als Vorlage in eine Multiplex-PCR eingesetzt (Abbildung 3.22).

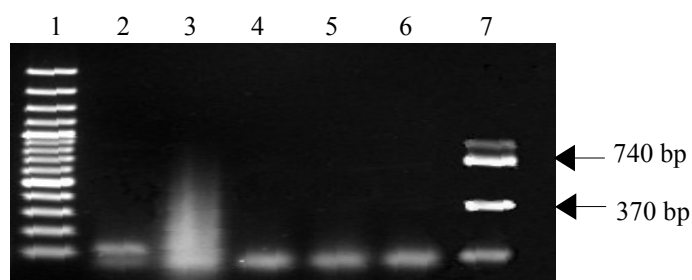


Abbildung 3.23: Multiplex-PCR unter Verwendung der isolierten Gesamt-RNA als Vorlage. Dargestellt ist das Ergebnis der Multiplex-PCR unter Verwendung der Gesamt-RNA als Vorlage. Verwendet wurden die Primerpaare Tef1Tabak_s (946)/ Tef1Tabak_r (947) und scFv_multipl_for (970)/ scFv_multipl_rev (971) nach dem Protokoll der Multiplex-RT-PCR (2.2.27). Aufgetragen wurden 5 µl Marker (Bahn 1), Proben putativ transgener Pflanzen (Bahn 2-6) und als Kontrolle das Ergebnis einer Multi-Plex-PCR mit cDNA einer transgenen Pflanze.

Zu erkennen ist deutlich, dass keine Amplifizierung erfolgte und somit keine Verunreinigungen durch DNA in der isolierten Gesamt-RNA vorliegen.

3.12 Transiente Transformation von *N. benthamiana*

Für die transiente Expression von scFv VP2 20 in *N. benthamiana* wurde der binäre Vektor pcIPG+35S+scFv VP2 20 verwendet (3.10). Es erfolgte eine Infiltration von einzelnen Blättern mit Agrobakterien (2.2.13) und eine anschließende Proteinextraktion (2.2.18). Mit diesem Proteinextrakt wurde eine SDS-PAGE mit anschließender Immunfärbung (Abbildung 3.24) und Silberfärbung (Abbildung 3.25) durchgeführt.

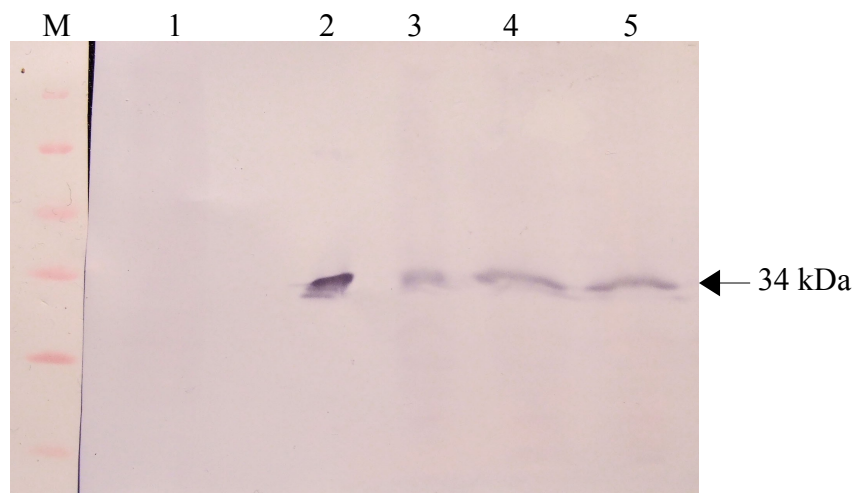


Abbildung 3.24: Transiente Expression von scFv VP2 20 in Blättern von *Nicotiana benthamiana*. Die Proteinextrakte wurden auf einem Polyacrylamidgel (12%) aufgetrennt und anschließend mit dem *Flag peptide*, *mouse antibody* (Novitek) und dem *Alkaline Phosphatase conjugated Affinity Purified Anti-mouse IgG (H&L)* (Rockland) immungefärbt. Aufgetragen wurden 10 µl Marker und je 20 µl Proben (M: Marker; Bahn 1: nicht transgene Pflanze; Bahn 2: Positivkontrolle mit dem aus *E. coli* aufgereinigtem scFv; Bahn 3-5: Extrakte von transient transformierten Blättern).

Deutlich ist eine dem scFv entsprechende Bande bei 34 kDa in der Positivkontrolle sowie in den transient transformierten Blättern zu erkennen. Eine entsprechende Bande in der nicht transgenen Kontrollpflanze ist nicht zu finden.

Zusätzlich wurden die Extrakte mittels einer Auftrennung über eine SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung überprüft (Abbildung 3.25).

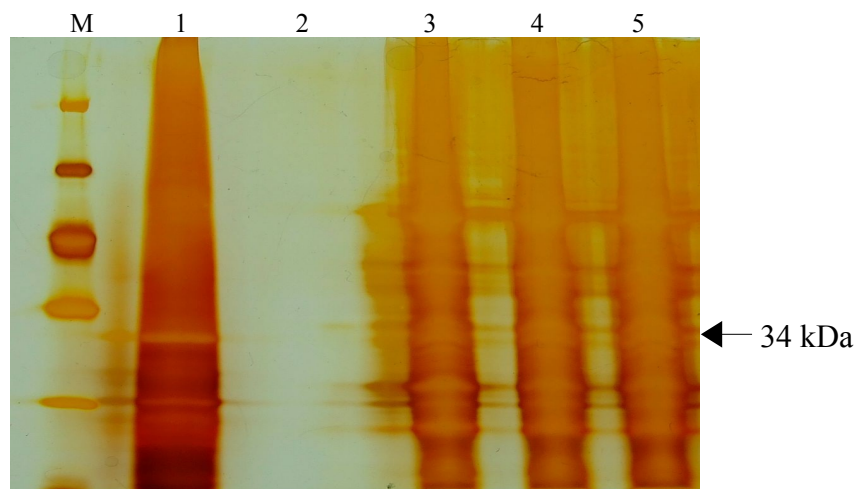


Abbildung 3.25: Proteinextrakte der mit scFv VP2 20 transient transformierten Blätter von *Nicotiana benthamiana*. Die Extrakte wurden auf einem Polyacrylamidgel (12%) aufgetrennt und anschließend mit einer Silberfärbung sichtbar gemacht. Aufgetragen wurden 10 μ l Marker und je 20 μ l Proben (M: Marker; Bahn 1: nicht transgene Pflanze; Bahn 2: Positivkontrolle mit dem aus *E. coli* aufgereinigtem scFv; Bahn 3-5: Extrakte von transient transformierten Blättern).

Die Silberfärbung zeigt die erfolgreiche Extraktion der gesamten Pflanzenproteine an. Eine Identifikation des scFv ist aufgrund der Vielzahl der Proteine nicht möglich. In der Positivkontrolle ist die Bande des scFv bei 34 kDa nicht zu erkennen.

4 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Entwicklung eines scFv-Antikörpers gegen das aviäre Enzephalomyelitis Virus, einer weltweit verbreiteten Geflügelkrankheit. Dieser sollte mittels der Methode des „Phage Displays“ aus der semi-synthetischen humanen Antikörperphagenbank ETH-2 selektiert werden (Pini *et al.*, 1998) und hinsichtlich seiner Bindungseigenschaften charakterisiert werden. Der in Pflanzen produzierte Antikörper soll bei entsprechender Eignung in einem ELISA-basierten serologischen Testsystem zum quantitativen Nachweis von Virusantigen zum Einsatz kommen. Hierdurch kann das bestehende System, welches auf *in-vivo*-Titration im embryonierten Hühnerei basiert, verzichtet werden. Zusätzlich bieten immunologische Nachweisverfahren den Vorteil, mit relativ geringem Zeit- und Personalaufwand auch eine große Probenzahl schnell zu bearbeiten.

Bisher existieren noch keine in der Literatur beschriebenen Antikörper gegen das AE Virus.

Expression des rekombinanten Hüllproteins VP2

Für das Selektionsverfahren von rekombinanten Antikörperfragmenten sollte zusätzlich zur Verwendung des kompletten Viruspartikels als Antigen ein rekombinant exprimiertes Phagenhüllprotein eingesetzt werden. Das Verfahren der bakteriellen Expression von Virushüllproteinen und deren Einsatz als Antigen ist in der Literatur bereits beschrieben (Smith *et al.*, 1995; Chon-Seng *et al.*, 2007; Gulati-Sakhuja *et al.*, 2009). Als erster Schritt erfolgte eine reverse Transkription und Amplifikation von Teilen des Virusgenoms und die Klonierung des VP2-Gens in den Expressionsvektor pASK-IBA45plus (3.1). Hier liegt das Gen unter der Kontrolle eines *tetA*-Promotors. Dieser kann durch die Zugabe von 200 ng/ml Anhydrotetracyclin, einer nicht antibiotisch wirksamen Konzentration, induziert werden. Durch die konstitutive Expression des *tet*-Repressorgens, welches zusätzlich auf dem Expressionsvektor kodiert ist, wird eine vollständige Repression des Promotors in Abwesenheit des Induktors gewährleistet (Skerra 1994; Loferer *et al.*, 1997).

Die Arbeitsgruppe um Wei fand 2008, dass VP1 das hauptsächliche immunogene Protein mit den bedeutendsten neutralisierenden Epitopen im AE Virus darstellt (Wei *et al.*, 2008). Immunisierungen von Hühnern mit den Proteinen VP1, VP3 und VP0, dem Vorläuferprotein

von VP2 und VP4, zeigten, dass VP1 die Bildung von neutralisierenden Antikörpern induziert, wohingegen VP3 und VP0 dies nur in einem geringen Maße tun (Wei *et al.*, 2008). Im Hinblick auf diese Ergebnisse wäre eine die Verwendung von VP1 als Antigen von Vorteil gewesen. Zum Zeitpunkt der Klonierungsarbeiten lagen noch keine Erkenntnisse hinsichtlich der Immunogenität der einzelnen Hüllproteine des AEV vor.

Durch den n-terminalen *Strep*-tag II des in *E. coli* rekombinant exprimierten VP2-Proteins war eine Affinitätschromatographie über eine *Strep*-Tactin Sepharose Säule möglich (3.2). Der *Strep*-Tag weist eine intrinsische biochemische Affinität zu dem Protein Streptavidin auf. Die Streptavidinmutante „1“, die inzwischen auch als *Strep*-Tactin bezeichnet wird, zeigt eine deutlich stärkere Bindung an den *Strep*-Tag II als herkömmliches Streptavidin (Korndörfer und Skerra, 2002). Die Elution des rekombinanten Proteins erfolgt vorzugsweise mit Desthiobiotin, einem oxidationsunempfindlichen Derivat von D-Biotin,

Die Eluatfraktionen der Aufreinigung des VP2-Proteins über die *Strep*-Tactin Sepharose Säule zeigten zusätzlich zu den starken Banden des VP2-Proteins deutliche Verunreinigungen mit zwei Wirtsproteinen (Abbildung 3.4). Für die Identifikation dieser Proteine wurde eine Analyse mittels Tandem-MS am Institut für klinische Chemie der Campus Forschung Hamburg durchgeführt. Es gelang die Identifizierung als Heatshock-Proteine Hsp60 und Hsp70 (3.2). Das Hsp70-System spielt eine wichtige Rolle bei der Translokation von Proteinen durch zelluläre Membranen, der Faltung neu synthetisierter Proteine, der Disassemblierung oligomerer Proteinkomplexe, beim Abbau instabiler Proteine durch Zielsteuerung dieser Moleküle zu Proteasen und bei der Kontrolle von regulatorischen Proteinen, wie z. B. Transkriptionsfaktoren (Hartl, 1996). Das auch Chaperonin-System genannte Hsp60 System, welches in *E. coli* auch als GroEL bezeichnet wird, ist das einzige essentielle Chaperoninsystem in *E. coli*. Alle *Hsp60*-Gene werden konstitutiv exprimiert, die Expression kann aber unter Stressbedingungen verstärkt werden (Hartl *et al.*, 1992). Durch den durch die Überexpression von VP2 verursachten Stress kommt es zu einer verstärkten Expression der Hsp-Proteine. Aufgrund der Komplexbildung der Hsp-Proteine mit VP2 zur Faltung kommt es vermutlich zu einer Koaufrreinigung.

Für die Sicherstellung des ausreichenden Reinheitsgrades des Antigens für das nachfolgende Panningverfahren wurde das VP2 von den Hitzeschockproteinen durch Elektroelution abgetrennt (3.2). Es konnte gezeigt werden, dass durch die zusätzlichen Aufreinigungsschritte ein vollständig sauberes Antigen erhalten werden konnte (Abbildung 3.5). Anreicherungen von Phagen gegen im Antigen enthaltene Verunreinigungen konnten somit ausgeschlossen werden.

Die Antikörpergenbibliothek ETH-2

Für die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Selektion wurde die ETH-2 Bank verwendet (Viti *et al.*, 2000).

Grundlage der Bibliothek bilden die humanen Keimbahnlinien DP-47 für die schwere Kette sowie DPK-22 und DPL-16 für die leichte Kette. Diese Segmente gehören zu den am häufigsten Vorkommenden im natürlichen B-Zell Repertoire (Pansri *et al.*, 2009). Das DP-47 Segment gehört zu einer Gruppe von VH₃-Domänen, die vorteilhafte biochemische Eigenschaften für die Expression von scFvs aufweisen. Die Expression in *E. coli* ist ohne Entstehung von „inclusion bodies“ und Dimeren möglich und die starke Bindung an Protein A an die gefalteten VH Domänen, hergeleitet durch das DP-47 Segment, lässt eine einfache Aufreinigung zu. Durch zufällige Austausche in definierten Bereichen des CDRL₃ und CDRH₃, den variabelsten Bereichen eines Antikörpers (Kuroda *et al.*, 2009), wurde eine Diversität von 5×10^8 unabhängigen Klonen erzielt. Dies stellt im Vergleich zu anderen Antikörpergenbibliotheken eine durchschnittliche Größe dar (Hust und Dübel, 2004). Der Bereich des CDR₃ hat zudem die zentrale Funktion bei der initialen Bindung des Antigens durch den Antikörper und zeigt die meisten Aminosäureinteraktionen zum Antigen (Kabat und Wu, 1991; Padlan, 1994). Die durch die ausschließliche Randomisierung der CDR₃ Regionen entstehenden Nachteile der „single framework“ Konstruktion liegen in der Verminderung der Diversität der Bindungsmöglichkeiten, da auch die „framework“ Regionen sowie die CDR₁ und CDR₂ Bereiche zur Diversität und Affinität beitragen.

Die Weiterentwicklung der ETH-2 Bank, genannt ETH-2-Gold, enthält mit 3×10^9 eine größere Anzahl unabhängiger Klone. Beibehalten wurden die humanen Keimbahnlinien DP-47, DPL-16 sowie DPK-22, da deren Vorteile bestätigt werden konnten. Es zeigte sich, dass der Vektor pDN322 der ETH-2, ein pHEN1 Derivat, genetische Instabilität nach wiederholten Passagen aufwies. Klone mit einer Deletion im GenIII wurden während der Selektionsrunden bevorzugt angereichert. Aufgrund dessen erfolgte die Klonierung der neuen Bibliothek in den Vektor pHEN1 (Silacci *et al.*, 2005). Die Beobachtung der Anreicherung von unvollständigen Klonen konnte in dieser Arbeit auch beobachtet werden. Hierauf wird an anderer Stelle genauer eingegangen.

Selektion von scFv-Antikörpern

Bei einem „Phage Display“ Verfahren zur Selektion antigen-spezifischer scFv-Phagen sollte es zu im Verlauf von maximal sechs Panningrunden zu einem Titeranstieg der eluierten Phagen von $\sim 10^4$ auf $\sim 10^8$ cfu kommen (Breitling und Dübel, 1997). Eine zu geringe Anzahl von Selektionsrunden kann zu einer nicht ausreichenden Anreicherung spezifischer Phagen führen (Sche *et al.*, 2001). Bei einer zu hohen Anzahl von Selektionsrunden kann es hingegen zu einer Anreicherung von mutierten oder unvollständiger scFv-Phagen kommen, da diese in *E. coli* bevorzugt amplifiziert werden (Tur *et al.*, 2001). In dieser Arbeit wurden deshalb jeweils drei Selektionsrunden bei den Panningverfahren gegen VP2 sowie die Viruspartikel durchgeführt, um eine gute Anreicherung zu gewährleisten. Der in der Literatur beschriebene optimale Titerverlauf konnte in dieser Arbeit nicht erzielt werden.

Selektion von scFv-Antikörpern gegen VP2

Bei dem Panningverfahren gegen das rekombinant in *E. coli* exprimierte Virushüllprotein VP2 zeigte sich ein starker Abfall des Titers der eluierten scFv-Phagen in der zweiten Selektionsrunde (Abbildung 3.5 und Tab. 3.1). Der zu erwartende Titeranstieg durch die Selektion spezifisch bindender Phagen und deren Amplifizierung konnte nicht gezeigt werden. Eine mögliche Erklärung liegt in der Anreicherung von Phagen mit mutiertem scFv und GenII, welche bevorzugt amplifiziert werden. Eine genetische Instabilität des Vektors in Bezug auf das GenIII konnte auch durch Silacci *et al.* (2005) nachgewiesen werden. Der Anteil an Phagen ohne Insert kann in zwei Panningrunden von 1% auf 60% steigen (de Bruin *et al.*, 1999). Die Anreicherung von mutierten Phagen in der zweiten Selektionsrunde zeigt auch der im Vergleich zu der ersten und letzten Selektionsrunde in Relation zur Elution hohe Waschtiter. In der dritten Selektionsrunde ist hingegen ein deutlicher Anstieg der eluierten Phagen zu verzeichnen. Ursächlich hierfür war die Anreicherung spezifisch bindender Phagen aus der zweiten Selektionsrunde. Eine Anreicherung kann auch durch den in Relation zum Elutionstiter niedrigen Titer des letzten Waschschritts gezeigt werden. Trotz den abfallenden Titers in der zweiten Selektionsrunde kam es zu einer Anreicherung von Phagen.

Selektion von scFv Antikörper gegen AEV

Bei der Selektion von scFv-Phagen gegen das AE Virus zeigte sich ein kontinuierlicher Abfall des Elutionstiters (Abbildung 3.7 und Tab. 3.2). Eine Erklärung für den untypischen Titerverlauf könnte im verwendeten Antigen liegen. Die Aufreinigung der als Antigen verwendeten Viruspartikel erfolgte durch LAH. Dort wurde ein neues Aufreinigungsprotokoll erarbeitet, da beschriebene Protokolle nicht zu den gewünschten Ergebnissen führten. Auch das neue Protokoll führte zu einer großen Anzahl von Störstoffen in der Probe. Deswegen wurde vor der eigentlichen Selektion eine Präselektion mit einer Probe aus virusfreien Hühnern durchgeführt, um die Anzahl unspezifisch bindender Phagen zu verringern. Dieses Verfahren wird auch als substraktives Panning bezeichnet. Eine vollständige Eliminierung unspezifisch bindender scFv-Phagen konnte grundsätzlich nicht erfolgen, da jedes Antikörper-Antigen-System einer Kinetik der Geschwindigkeitskonstanten K_A und K_D unterliegt, wodurch sich ein Gleichgewicht zwischen gebundenen und freien Antikörpern einstellt (Burioni 2002). Vermutlich wurde durch das substraktive Panning vor jeder Selektionsrunde ein Großteil der an den Störstoffen angereicherten Phagen entfernt. Die Anreicherung der verbliebenen an die Störstoffe bindenden Phagen und deren Entfernung durch Deselektion vor der nächsten Panningrunde führte zu einem kontinuierlichen Titerabfall, da dem Panningverfahren stetig bindende Phagen entzogen wurden. Aufgrund der geringen Reinheit des Antigens und der dadurch verursachten geringen Konzentration konnte dies nicht durch die gewünschten spezifisch bindenden Phagen aufgefangen werden.

Analysen der selektierten scFvs

Aus der letzten Selektionsrunde im Panning erhaltene scFv-Klone wurden molekularbiologisch analysiert.

Zunächst wurde eine PCR zur Überprüfung der Vollständigkeit des *scFv*-Gens durchgeführt, um den Prozentsatz an vollständigen Klonen zu ermitteln. Wie schon erwähnt, kann es während des Pannings zu einer bevorzugten Amplifizierung und Anreicherung von mutierten scFvs kommen. Diese können Deletionen, interne Stoppcodons sowie Leserasterverschiebungen aufweisen (Carcamo *et al.*, 1998; Hust *et al.*, 2006), was einen Verlust des ORF zur Folge haben kann. Die Anreicherung von Klonen ohne intakten ORF kann zum Teil auf die inhibitorischen Effekte des pIII-Proteins bei der Infektion durch den

Helferphagen zurückgeführt werden (Li *et al.*, 2002). Zur Überprüfung der Expression des scFv wurde die sogenannte DOC-Methode (2.2.48) durchgeführt. Bei Expression des scFv als Fusionsprotein mit dem pIII der Phagen zeigt *E. coli* eine Empfindlichkeit gegenüber dem Detergenz Deoxycholat, was sich in reduziertem Wachstum äußert (Li *et al.*, 2002). Diese Methode ermöglicht die Analyse einer Vielzahl von Klonen in kürzester Zeit. Dies ist ein deutlicher Vorteil gegenüber des klassischen Expressionstests mit Expressionskultur, SDS-PAGE und Immunfärbung.

Das Ergebnis der PCR-Analysen (3.5.1) zeigte einen Prozentanteil an Klonen mit vollständigem scFv-Gen von 54 bzw. 45% (Tab. 3.3). Dies sind relativ geringe Werte gegenüber früheren Arbeiten mit der ETH-2 Bank (Ottleben 2006). Hier konnten Werte von über 90% erzielt werden. Dies liegt zum einen sicherlich an dem Alter der Bank und den damit verbundenen Amplifizierungen, was zu einer Anreicherung von unvollständigen Klonen führte. Die Ersteller der ETH-2 Bank konnten nachweisen, dass der verwendete Vektor pDN322 genetische Instabilität zeigte, wodurch Mutationen enthaltende Klone angereichert wurden (Silacci *et al.*, 2005). Auch neu erstellte Banken auf Grundlage der ETH-2 Bank, die noch keinen Amplifizierungen unterzogen worden waren, zeigten Anteile an Vollständigklonen von bis zu 98,5% (Klee 2009).

Die Expressionsanalyse mittels der DOC-Methode lieferte einen prozentualen Anteil an exprimierenden Klonen von 69 bzw. 63% (Tab. 3.4). Dies liegt zum Teil deutlich über den Werten, die Lauer und Ottleben bei ihren Arbeiten mit der ETH-2 Bank erzielen konnten (Lauer 2005; Ottleben 2006). In Betracht gezogen werden muss die Subjektivität der Beurteilung des Wachstums bei Verwendung der DOC-Methode. Dadurch kann es zu starken Abweichungen in den Aussagen zur Exprimierbarkeit kommen. Die Methode liefert somit auch nur einen Hinweis, bei welchen Klonen mit großer Wahrscheinlichkeit intakte ORFs zu finden sind. So wurde bei einem der sequenzierten Klone, die bei der Expressionsanalyse als positiv bewertet wurden, ein internes Stopkodon und eine Leserasterverschiebung festgestellt (3.5.3).

Eine weitergehende Analyse der gegen VP2 gerichteten Klone erfolgte mittels eines ELISA (3.5.6). Hierzu erfolgte die Produktion von löslichen scFvs in Mikrotiterplatten (2.2.39). Dies wird ermöglicht durch Bakterienstämme, die das im Vektor integrierte Amber-Stopkodon zwischen dem scFv und dem *gIII* erkennen, wie z.B. *E. coli* TB1. Als Antigen im ELISA wurde AEV Impfstoff verwendet, welcher komplette Viruspartikel enthält. Dies sollte zum Ausschluss derjenigen Antikörperfragmente führen, deren Paratop gegen eine im vollständigen Viruspartikel innenliegende Struktur des VP2-Proteins gerichtet ist. Eine

Bindung sollten somit nur solche Klone zeigen, die gegen ein auf der Virusoberfläche präsentiertes Epitop gerichtet sind. Zusätzlich können sich durch das Selektionsverfahren gegen das vollständig aufgereinigte VP2-Protein keine Klone gegen Störstoffe angereichert haben, da diese im Panningverfahren gegen VP2 durch die andere Herstellung und Aufreinigung des Antigens nicht vorhanden waren. Im Panning gegen AEV hingegen ist eine Anreicherung gegen die Störstoffe möglich. Bei einem ELISA mit Klonen, die gegen das komplette Virus mit den in der Aufreinigung enthaltenen Störstoffen isoliert wurden, hätte die Möglichkeit bestanden, im ELISA eine Bindung nachzuweisen, die nicht gegen das gewünschte Antigen sondern gegen einen Störstoff gerichtet ist. Des weiteren ist zu beachten, dass das Selektionsverfahren durch Immobilisierung des Antigens in Mikrotiterplatten durchgeführt wurde. Dies kann zu einer partiellen Denaturierung des Proteins führen (Lundquist *et al.*, 2006). Dadurch kann es zur Isolierung von scFv-Fragmenten kommen, die das denaturierte Antigen erkennen, nicht aber das native Protein. Hier zeigt sich ein weiterer Vorteil der Verwendung der zwei unterschiedlich dargestellten und aufgereinigten Antigene. Klone, deren Bindung gegen denaturierte Epitope des VP2-Proteins gerichtet ist, sollten keine Bindung an das native Virus zeigen. Aufgrund der Ergebnisse des ELISA wurden fünf Klone für die weitere Charakterisierung mittels Oberflächenplasmonresonanz ausgewählt.

Aufreinigung und Charakterisierung

Zur weiteren Charakterisierung von einzelnen scFv Klonen war eine Aufreinigung vonnöten. Diese erfolgte aus dem Kulturüberstand einer *E. coli* TB1 Expressionskultur. Bei der Sekretion von Proteinen in das Periplasma von gram-negativen Bakterien handelt es sich um einen natürlichen Prozess (Pugsley 1993) welcher abhängig von einer Signalsequenz ist (Plückthun *et al.*, 1996). Bei der *pelB* Signalsequenz der scFvs handelt es sich um die Pectatlyase B aus *Erwinia carotovorum*. Neben dem Effekt der Lokalisierung kann eine Stimulation der Expression hinzukommen (Sletta *et al.*, 2007). Zusätzlich enthält der periplasmatische Raum im Gegensatz zum Cytoplasma ein biochemisches Milieu, in dem Antikörper korrekt gefaltet werden und es zu einer richtigen Verknüpfung der Disulfidbrücken kommt. Aufgrund der partiellen Durchlässigkeit der Membran von *E. coli* (Plückthun und Skerra 1989) konnte die Isolierung der scFvs direkt aus dem Kulturüberstand erfolgen. Die Durchlässigkeit der äußeren Membran ist abhängig von bestimmten Kultivierungsbedingungen, wie der Inkubationszeit und -temperatur. Ebenfalls kann es zu

einem Einfluss der Sequenz des produzierten Proteins auf die Membranpassage kommen (Plückthun, 1991; Kipriyanov *et al.*, 1997).

Durch die Zugehörigkeit des DP-47 Segments der schweren Kette der ETH-2 Bank zur Gruppe der VH₃-Domänen konnte eine Aufreinigung aller scFvs über Protein A erfolgen (Hoogenboom und Winter 1992). Die Expression und Aufreinigung wurde über SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung bzw. Western Blot und Immunfärbung auf ihre Reinheit überprüft (3.6). Hierbei ist zu beachten, dass nicht alle produzierten scFvs korrekt gefaltet und damit funktionell sind (Kipriyanov *et al.*, 1997). Parallel zur Aufreinigung über Protein A wurde eine kostengünstigere Aufreinigung über den c-terminalen *His*-Tag vorgenommen (3.6). Die Elution erfolgte mit einem ansteigenden Imidazolgradienten. Es zeigten sich im Vergleich zu der Aufreinigung über Protein A starke Verunreinigung mit Wirtsproteinen nach dem Säulenlauf (Abbildung 3.15). Zusätzlich wurde die Identifikation der scFv enthaltenen Eluatfraktionen über die Absorption bei 280 nm im Verlaufsprotokoll der ÄKTAprime™ plus durch den stetigen Anstieg der Kurve erschwert (Abbildung 3.14). Dies ist auf die Eigenabsorption von nicht vollständig reinem Imidazol zurückzuführen. Aufgrund dieser Schwierigkeiten wurde die Aufreinigung über Protein A vorgezogen und für alle Proben durchgeführt.

Analysen von scFv AEV5

Die Sequenzierung von neun gegen das komplette AE Virus gerichteten Klonen ergab eine Sequenzübereinstimmung von drei Klonen (3.5.3). Es gibt mehrere Faktoren, welche die Häufigkeit bestimmen, mit denen scFvs aus einer Bibliothek isoliert werden. Zum einen spielt eine geringe Toxizität und damit gute Produzierbarkeit eine Rolle. Dies führt zu einer hohen Anreicherung des scFv in den Selektionsrunden. Zum anderen wird die Wahrscheinlichkeit, einen bestimmten scFv zu isolieren, durch seine Affinität bestimmt: Je affiner, umso höher ist die Wahrscheinlichkeit, ihn während des Pannings zu isolieren.

Der angereicherte Klon scFv AEV5 wurde über Immunfärbungen näher charakterisiert. Im Dot Blot zeigte sich ein Signal sowohl in der Positivprobe als auch in der Negativkontrolle (Abbildung 3.9). Um Kreuzreaktionen im Dot Blot auszuschließen wurde eine weitere Immunfärbung der Negativkontrolle mit vorhergehender Auftrennung der Proteine mittels einer SDS-PAGE durchgeführt. Hier zeigte sich ein deutliches Signal (Abbildung 3.10). Trotz des subtraktiven Panningverfahrens ergab sich anscheinend eine Anreicherung von scFv-

Phagen gegen die zahlreich in der Probe vorliegenden Störstoffe. Aufgrund dessen wurden weitere Arbeiten an Klonen, welche aus der Selektion gegen die kompletten Viruspartikel hervorgingen, eingestellt. Für das Panningverfahren war der Reinheitsgrad dieses Antigens zu gering.

Analysen von scFv VP2 20

Zur weiteren Charakterisierung von scFv VP2 20 wurde eine Immunfärbung mit dem VP2 Protein als Antigen und dem aufgereinigten scFv als 1. Antikörper durchgeführt (Abbildung 3.16). Hierbei zeigt sich eine deutliche Bande bei 25,5 kDa, welche dem VP2 Protein entspricht. Eine Bindung von scFv VP2 20 an das Hüllprotein konnte somit bestätigt werden. Zusätzlich wurde eine weitere ELISA durchgeführt, um die Bindung in diesem System zu bestätigen. Hierbei wurden zum Vergleich sowohl aufgereinigtes VP2 als auch Viruspartikel als Antigen eingesetzt (3.8). Deutlich ist im Ergebnis zu erkennen, dass der scFv sowohl das einzelne Hüllprotein als auch die Viruspartikel ohne deutlichen Unterschied erkennt (Tab. 3.7). Durch die Kontrolle mit dem Blockierungsreagenz ohne Verwendung eines Antigen kann davon ausgegangen werden, dass der scFv nicht gegen ein in dem Blockierungsreagenz vorliegenden Stoff gerichtet ist. Aufgrund der nachgewiesenen Bindung an das Virus, in dem natives VP2 vorliegt, kann ebenfalls ausgeschlossen werden, dass die Bindung an das denaturierte VP2-Protein erfolgt. Eine Anreicherung solcher Klone im Panning in Mikrotiterplatten kann vorkommen, da die Bindung von Proteinen an Mikrotiterplatten zur partiellen Denaturierung führen kann (Lundquist *et al.*, 2006).

Charakterisierung der scFvs mittels Oberflächenplasmonresonanz

Für die Charakterisierung selektierter scFv Klone hinsichtlich ihrer Spezifität und Affinität wurde in dieser Arbeit Oberflächenplasmonresonanzanalysen an einer Autolab Esprit durchgeführt. Das den Messungen zugrunde liegende Prinzip der Änderung des refraktischen Index auf der Oberfläche des Sensorchips erfordert, dass die für die Messung verwendeten Lösungen alle denselben Refraktionsindex aufweisen. Da die scFvs nach ihrer Aufreinigung im Elutionspuffer vorlagen, wurde eine Umpufferung in 1x PBS, was auch als Laufpuffer während der Analysen dient, vorgenommen.

Die Grundlage der Messungen bildet die Immobilisierung des Liganden an der Oberfläche des Sensorchips, an den der sich in Lösung befindende Analyt binden kann. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Immobilisierung der Viruspartikel und nicht der scFvs. Dies hat zum einen den Vorteil, dass Analysen verschiedener scFvs in unterschiedlichen Konzentrationen an einem Sensorchip möglich sind. Zum anderen wird das Problem umgangen, dass durch die Immobilisierung des Antikörperfragments die Funktionalität durch Konformationsänderungen verloren gehen könnte und die Zugänglichkeit zum Paratop für das Antigen unter Umständen nicht mehr möglich ist. Hingenommen wurde die Kopplung des größeren Bindungspartners, welche normalerweise zu vermeiden ist, da die Änderung der Masse durch die Bindung im Vergleich zur bereits gebundenen Masse relativ gering ist. Durch die sich wiederholende Oberflächenstruktur des Viruspartikels wird aber die Bindung von mehr als einem scFv-Molekül an einen Viruspartikel ermöglicht, was die Massenänderung wieder relativiert. Zusätzlich kann es nicht zu einer Maskierung des Epitops bei der Präsentation des Antigens kommen, welche bei der Kopplung von Proteinliganden möglich ist (Kortt *et al.*, 1997). Weiterhin ist die Analyse in Bezug auf die Sensitivität bei Verwendung von „small molecules“ als Analyten kritisch (Miura *et al.*, 2008).

Die Immobilisierung des Liganden konnte durch einen im Sensorgramm sichtbaren Anstieg der Grundlinie von 270 m° nachgewiesen werden (3.9.1 und Abbildung 3.17), welche auf eine Massenveränderung auf der Chipoberfläche und einer damit einhergehenden Änderung des SPR-Winkels. Mit der Oberflächenplasmonresonanzanalyse wurde die Dissoziationskonstante K_D von scFv VP2 20 bestimmt. Hierzu erfolgte die Messung unterschiedlicher Konzentrationen an scFv in Doppelansätzen (Abbildung 3.18). Um unspezifische Bindungen aus den Messergebnissen zu eliminieren, wurde eine Küvette lediglich mit Laufpuffer beschickt und deren Messdaten als Negativkontrolle verwendet. Zur Berechnung wurde das Signal der Negativkontrolle von dem der Testküvette abgezogen. Die Messungen zeigten eine deutliche Affinität des scFv zum AE Virus. Die Bestimmung erfolgt über den linearen Zusammenhang zwischen der Menge der an das Virus gebundenen scFvs, der dadurch entstehenden Änderung des refraktorischen Index, des refraktorischen Index der Lösung und des sich ergebenden SPR-Winkels (Stenberg *et al.*, 1991). Es zeigte sich ein für das Küvettensystem typischer Verlauf. Die Assoziationsphase startet mit Injektion des Analyten auf den Sensorchip. Es kommt zur Assoziation der scFvs an den Liganden. Der Verlauf der Assoziation ist eine Funktion der Assoziationsrate k_a , der Dissoziationsrate k_d und der Analytkonzentration. Optimalerweise stellt sich ein Gleichgewicht ein, in dem die Anzahl der assoziierenden Moleküle gleich der der dissoziierenden ist. An diesem Punkt stellt die

Änderung des Resonanzwinkels sich als Funktion der Antigenkonzentration, der Dissoziationskonstante K_D und der totalen Kapazität der Sensordisc dar. Mit Austausch der Pufferlösung beginnt die Dissoziationsphase, in der sich ein erneutes Gleichgewicht zwischen assoziierenden und dissoziierenden scFvs einstellt (Torreri *et al.*, 2005). Dies unterscheidet den Verlauf von dem des Biacore-Systems aufgrund der Verwendung einer Küvette statt eines kontinuierlichen Pufferstroms. Die Einstellung eines neuen Gleichgewichts bei der Dissoziation im Küvetten-System der Autolab Esprit, macht eine Berechnung der k_d unmöglich. Dies führt auch dazu, dass eine Bestimmung der Dissoziationskonstante K_D als Maß der Affinität durch Berechnung des Quotienten der Assoziationsrate k_a und Dissoziationsrate k_d nicht erfolgen kann (Alfthan 1998). Besser kann die Bestimmung der K_D durch den Teilbereich der Einstellung des thermodynamischen Gleichgewichts bei verschiedenen Konzentrationen des Analyten erfolgen. Dies hat die Vorteile, dass eine Modellierung der Bindungskinetik unnötig wird und es keine Abhängigkeiten von der Limitierung des Massentransfer-Effekts gibt (Huber *et al.*, 1999). In dieser Arbeit wurde aus den oben genannten Gründen die Methode der Verwendung des thermodynamischen Gleichgewichts angewendet. Für den scFv VP2 20 wurde eine K_D von 5,27 μM berechnet (3.9.2.1). Diese liegt im Bereich von anderen aus der ETH-2 Bank bereits isolierter Antikörperfragmenten (Lauer *et al.*, 2005; Ottleben, 2006).

Wie der scFv VP2 20 wurde auch die scFvs VP2 25, 26 und 28 einer Messung unterzogen. Im Gegensatz zu den Ergebnissen des scFv VP2 20 konnte dort keine Bindung an das Virus detektiert werden (Abbildung 3.19). Aus diesem Grund wurden die Arbeiten an diesen Klonen nicht weitergeführt.

Transformation von scFv VP2 20 in *Nicotiana tabacum*

Die erste Verwendung von Pflanzen als heterologe Produktionssysteme von rekombinanten Antikörpern wurde 1989 mit der Expression eines funktionalen auf dem monoklonalen anti-P3 IgI1 beruhenden Antikörper in transgenem Tabak dokumentiert (Hiatt *et al.*, 1989). Die Weiterentwicklung im Bereich der Antikörper- und Pflanzentechnologie hat zu der Expression diverser Antikörperformate in einer großen Anzahl unterschiedlicher transgener Pflanzen geführt (Fischer und Emans, 2000; Sparrow *et al.*, 2007; Ko *et al.*, 2009). In Pflanzen produzierte scFvs weisen die gleiche Affinität wie bakteriell produzierte auf (Ehsani *et al.*, 2003). Der Erhalt der Spezifität und Affinität gilt auch für in Pflanzen produzierte

monoklonale Antikörper (Ko *et al.*, 2009). Für die Expression von scFv VP2 20 in *N. tabacum* erfolgte die Klonierung in den binären Vektor pcIPG+35S zur Konstruktion von pcIPG+35S+cFv VP2 20 (3.10). Hier liegt der scFv unter der Kontrolle des viralen *Cauliflower Mosaic Virus* (CaMV) 2x35S Promotors (Odell *et al.*, 1985). Dieser findet häufig Verwendung bei der Transformation dikotyler Pflanzen und wird als konstitutiver, starker Promotor beschrieben (Benfey und Chua, 1990; Ma *et al.*, 2003). Durch die Verdopplung der Promotorsequenz konnte eine zusätzliche Aktivitätssteigerung herbeigeführt werden (Kay *et al.*, 1987). Der CaMV 2x35S Promotor wurde dem ebenfalls zur Verfügung stehenden EntCUP2 Promotor vorgezogen (Malik *et al.*, 2002). Die bis zum Zeitpunkt der Klonierungsarbeiten durchgeführten vergleichenden Analysen der beiden Promotoren bezüglich ihrer Expressionsstärke in Tabak zeigten eine stärkere Expression der unter der Kontrolle des 2x35S Promotors stehenden Gene (Philip Wolff, persönliche Mitteilung). Um die Ausbeuten an rekombinantem Protein zu erhöhen, wurde ein c-terminal fusioniertes KDEL-Retentionssignal verwendet, welches den Verbleib der Proteine im Endoplasmatischen Retikulum vermittelt. Dies erhöht die Stabilität und erwirkt eine stärkere Akkumulation des Proteins in Tabakblättern (Wandelt *et al.*, 1992). Zu einer weiteren Verstärkung der Expression wurde ein Ubiquitin 10 Intron in die LeB4-Leadersequenz integriert. Vain *et al.* (1996) konnten zeigen, dass die Transkription eines Transgens durch den Einbau eines Introns deutlich erhöht werden kann.

Der Vergleich der beiden Regenerationswege zeigt eine größere Anzahl regenerierter Sprosse bei Regenerationsweg I, bei dem die erste Regenerationsphase der transformierten Explantate auf PPT-freiem MSZ-Medium erfolgte (3.11). Dies widerspricht den Ergebnissen von Derboven (2009). Diese unterschiedlichen Ergebnisse könnten auf die Jahreszeiten der Regeneration zurückzuführen sein. In der Arbeitsgruppe konnte beobachtet werden, dass Explantate von *N. tabacum* im Sommer ein deutlich schnelleres Wachstum und eine insgesamt bessere Regeneration zeigten trotz Kultivierung in einer von den Außenbedingungen isolierten Klimakammer. Die in dieser Arbeit durchgeführten Transformationen erfolgten zum Großteil im Winter, wo ein insgesamt deutlich schlechterer Verlauf der Regeneration zu beobachten ist, wohingegen Derboven im Sommer transformierte. Zudem ist aufgrund der geringen Anzahl der Transformationen eine statistisch gesicherte Aussage nicht möglich. Arbeiten anderer Arbeitsgruppen zeigten jedoch deutliche Erfolge mit der sofortigen Selektion von Blattstücken von *N. tabacum* auf 5 mg/L PPT (Chilton und Que, 2003; Kang *et al.*, 2005).

Anhand einer Multiplex-PCR wurde die Integration der Antikörperfragmente in das Genom

von *N. tabacum* überprüft. Gleichzeitig wurde das Vorhandensein persistierender Agrobakterien überprüft, um falsch positive Ergebnisse auszuschließen (3.11.1). Zu diesem Zeitpunkt befanden sich die untersuchten Pflanzen noch in der *in-vitro* Kultur. In keinem Fall konnten persistierende Agrobakterien nachgewiesen werden. Dies spricht für die verwendete Transformationsmethode. Die Möglichkeit des Nachweises der Agrobakterien zeigte in allen Fällen die Positivkontrolle. Dies steht im Gegensatz zu Untersuchungen von Matzk *et al.* (1996), die persistierende Agrobakterien sowohl auf der Oberfläche als auch im Gewebe transgener *in-vitro* Tabakpflanzen noch nach bis zu zwölf Monaten nachweisen konnten. Auch hier kann davon ausgegangen werden, dass die Anzahl der im Rahmen dieser Arbeit getesteten Pflanzen zu gering war, um eine signifikante Aussage machen zu können.

Zum Nachweis der erfolgreichen Transkription des eingebrachten Antikörperfragments wurde eine Multiplex-RT-PCR an einigen ausgewählten Pflanzen durchgeführt (3.11.2). Falsch positive Ergebnisse durch DNA-Verunreinigungen konnten hierbei durch die Verwendung des Primerpaares 946/947 ausgeschlossen werden, welches auf Transkriptionsebene zur Amplifizierung eines um 100 bp kleineren Fragments als auf DNA-Ebene führt. Zusätzlich wurde eine PCR mit der isolierten Gesamt-RNA durchgeführt. Da RNA nicht als Vorlage in einer PCR dienen kann, sollten bei einer sauberen Präparation keine Banden amplifiziert werden. Dies konnte gezeigt werden (Abbildung 3.23) und somit eine Verunreinigung durch DNA ausgeschlossen werden. Die Transkription des Antikörperfragments konnte in den getesteten Pflanzen 3/09 1, 4/09 1.1 und 4/09 1.10 nachgewiesen werden. Die Expression des funktionalen scFv Proteins in stabil transformierten Pflanzen konnte nicht mehr im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen werden, da in den untersuchten Pflanzen das Gen eine Leserasterverschiebung aufwies. Aus Zeitgründen wurde daher eine transiente Transformation mit dem Antikörperfragment durchgeführt (3.12). Hier zeigte sich eine deutliche Expression des scFv VP2 20 in den transformierten Blättern (Abbildung 3.8). Die fehlende Bande in der Positivkontrolle in der ebenfalls durchgeführten Silberfärbung der Proben ist sicherlich auf die sehr geringe Konzentration des Proteins im Vergleich zu den Gesamtextrakten zurückzuführen (Abbildung 3.9).

5 Zusammenfassung und Ausblick

In der vorliegenden Arbeit sollten rekombinante Antikörper gegen das aviäre Enzephalomyelitis Virus hergestellt und anschließend in Pflanzen exprimiert werden. Hierzu wurde eine „Phage Display“ Verfahren angewendet, mit dem single chain Antikörper aus der semisynthetischen Phagenbank ETH-2 isoliert wurden. Als Antigen wurden sowohl komplette Viruspartikel verwendet als auch ein rekombinant exprimiertes Phagenhüllprotein.

Es konnte gezeigt werden, dass die Verwendung von rekombinant exprimiertem Hüllprotein zahlreiche Vorteile aufwies. Durch die Art der Aufreinigung konnte eine ausreichende Reinheit für das Panningverfahren erzielt werden. Die Möglichkeit des Wechsels von reinem VP2 zu im Virus vorliegenden VP2 als Antigen ermöglichte den Ausschluss von scFvs, die entweder im Virus innenliegende Bereiche des VP2 oder denaturiertes VP2 erkennen. Zusätzlich konnte die Bindung an im Impfstoff vorliegende Störstoffe ausgeschlossen werden, da diese im Panningverfahren nicht vorhanden waren und eine Anreicherung gegen diese nicht erfolgen konnte.

Aus der Selektion mit dem rekombinanten Phagenhüllprotein konnte der scFv VP2 20 isoliert werden, für den eine Bindung mittels ELISA und Oberflächenplasmonresonanz an das AE Virus nachgewiesen werden konnte. Die transiente Expression des scFv VP2 20 in Tabak wurde erfolgreich durchgeführt und zeigte die Exprimierbarkeit des scFv in der Pflanze.

In weiteren Arbeiten muss der aus der Pflanze isolierte scFv weitergehend charakterisiert und auf seine Eignung im ELISA zum immunologischen Nachweis von AEV untersucht werden. Dies soll sowohl für das transient als auch das stabil exprimierte Antikörperfragment durchgeführt werden. Zusätzlich muss ein Vergleich der Sensitivität und Spezifität mit gegen das AE Virus entwickelten polyklonalen Antikörpern aus Huhn und Kaninchen durchgeführt werden.

6 Literaturverzeichnis

- Adey, NB, R Guo, HL Hanson, JE Rider, AB Sparks, und BK Kay. 1996. Construction and screening of M13 phage-displayed random peptide libraries. *Methods in molecular and cellular biology* 6, no. 1: 3-14.
- Albiston, HE. 1966. Diseases of domestic animals in Australia. In *Protozoan and virus diseases*, hg. v. HR Seddon, 4:viii, 257 p. ;. 2. Aufl. Canberra: Dept. of Health.
- Alfthan, K. 1998. Surface plasmon resonance biosensors as a tool in antibody engineering. *Biosensors & bioelectronics* 13, no. 6: 653-663.
- Beckman, RA, LM Weiner, und HM Davis. 2007. Antibody constructs in cancer therapy - Protein engineering strategies to improve exposure in solid tumors. *Cancer* 109, no. 2: 170-179.
- Benfey, PN, und NH Chua. 1990. The cauliflower mosaic virus 35s promoter - combinatorial regulation of transcription in plants. *Science* 250, no. 4983: 959-966.
- Bird, RE, K D Hardman, J W Jacobson, S Johnson, B M Kaufman, S M Lee, T Lee, S H Pope, G S Riordan, und M Whitlow. 1988. Single-chain antigen-binding proteins. *Science* 242, no. 4877 (Oktober 21): 423-426.
- Blum, M, H Beier, und HJ Gross. 1987. Verbesserte Silberfärbung von Pflanzenproteinen, RNA und DNA in Polyacryamidgelen. *Elektrophoresis* 8: 93-99.
- Breitling, F, S Dübel, T Seehaus, I Klewinghaus, und M Little. 1991. A surface expression vector for antibody screening. *Gene* 104, no. 2: 147-153.
- Breitling, F, und S Dübel. 1997. *Rekombinante Antikörper*. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- de Bruin, R, K Spelt, J Mol, R Koes, und F Quattrocchio. 1999. Selection of high-affinity phage antibodies from phage display libraries. *Nature biotechnology* 17, no. 4: 397-399.
- Burioni, R. 2002. Blocking immunodominant epitopes by competitive deselection. *Methods in molecular biology* 178: 173-177.
- Butterfield, WK, RE Luginbuhl, und C F Helmboldt. 1969. Characterization of avian encephalomyelitis virus (an avian enterovirus). *Avian diseases* 13, no. 2: 363-78.
- Calnek, BW. 2003. Avian Encephalomyelitis. In *Diseases of poultry*, hg. v. YM Saif, HJ Barnes, JR Glisson, AM Fadly, LR McDougal, und DE Swayne, 271-282. 11. Aufl. Iowa: Iowa State University Press.

- Calnek, BW, und PJ Taylor. 1960. Studies on avian encephalomyelitis. III immune response to beta-propiolactone inactivated virus. *Avian diseases* 4: 116-121.
- Carcamo, J, MW Ravera, R Brissette, O Dedova, JR Beasley, A Alam-Moghe, CH Wan, A Blume, und W Mandecki. 1998. Unexpected frameshifts from gene to expressed protein in a phage-displayed peptide library. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95, no. 19: 11146-11151.
- Cheville, NF. 1970. The influence of thymic and bursal lymphoid systems in the pathogenesis of avian encephalomyelitis. *The American journal of pathology* 58, no. 1: 105-25.
- Chilton, MDM, und QD Que. 2003. Targeted integration of T-DNA into the tobacco genome at double-stranded breaks: New insights on the mechanism of T-DNA integration. *Plant physiology* 133, no. 3: 956-965.
- Chon-Seng, T, TP Hwa, OC Ang, und HM Daud. 2007. Cloning and expression of papaya ring spot virus (PRSV) coat protein gene in bacteria. *Proceedings of the 1st international symposium on papaya*, no. 740: 141-145.
- Clackson, T, HR Hoogenboom, AD Griffiths, und G Winter. 1991. Making antibody fragments using phage display libraries. *Nature* 352, no. 6336: 624-628.
- Conrad, U, und U Fiedler. 1998. Compartment-specific accumulation of recombinant immunoglobulins in plant cells: an essential tool for antibody production and immunomodulation of physiological functions and pathogen activity. *Plant molecular biology* 38, no. 1-2: 101-109.
- Das, D, J Kriangkum, LP Nagata, RE Fulton, und MR Suresh. 2004. Development of a biotin mimic tagged ScFv antibody against western equine encephalitis virus: bacterial expression and refolding. *Journal of virological methods* 117, no. 2: 169-177.
- Davies, DR, und H Metzger. 1983. Structural basis of antibody function. *Annual review of immunology* 1: 87-117.
- De Jaeger, G, C De Wilde, D Eeckhout, E Fiers, und A Depicker. 2000. The plantibody approach: expression of antibody genes in plants to modulate plant metabolism or to obtain pathogen resistance. *Plant molecular biology* 43, no. 4: 419-428.
- Denecke, J, R Derycke, und J Botterman. 1992. Plant and mammalian sorting signals for protein retention in the endoplasmic reticulum contain a conserved epitope. *The EMBO journal* 11, no. 6: 2345-2355.
- Derboven, E. 2009. Expression rekombinanter Antikörperfragmente gegen das tumorassoziierte Antigen MUC1 in Pflanzen. Leibniz Universität Hannover.

- Dorokhov, DB, und E Klocke. 1997. A rapid and economic technique for RAPD analysis of plant genomes. *Genetika* 33, no. 4: 443-450.
- Edelmann, GM. 1973. Antibody structure and molecular immunology. *Science* 180, no. 4088: 830-840.
- Ehsani, P, A Meunier, F Nato, A Jafari, A Nato, und P Lafaye. 2003. Expression of anti human IL-4 and IL-6 scFvs in transgenic tobacco plants. *Plant molecular biology* 52, no. 1: 17-29.
- Eisengarten, HF. 1992. Aviäre Enzephalomyelitis. In *Krankheiten des Wirtschaftsgeflügels. Ein Handbuch für Wissenschaft und Praxis*, hg. v. G Heider und G Monreal, I:504-510. Jena und Stuttgart: J. Gustav Fischer Verlag.
- Ewert, S, T Huber, A Honegger, und A Plückthun. 2003. Biophysical properties of human antibody variable domains. *Journal of molecular biology* 325, no. 3: 531-553.
- Fischer, R, und N Emans. 2000. Molecular farming of pharmaceutical proteins. *Transgenic research* 9, no. 4-5: 279-299.
- Fuchs, P, F Breitling, S Dübel, T Seehaus, und M Little. 1991. Targeting recombinant antibodies to the surface of Escherichia coli - fusion to a peptidoglycan associated lipoprotein. *Bio/technology* 9, no. 12: 1369-1372.
- Gosting, LH, BW Grinnell, und M Matsumoto. 1980. Physicochemical and morphological characteristics of avian encephalomyelitis. *Veterinary microbiology* 5, no. 2: 87-100.
- Griffiths, AD, M Malmqvist, JD Marks, JM Bye, MJ Embleton, J McCafferty, M Baier, u. a. 1993. Human antiself antibodies with high specificity from phage display libraries. *The EMBO journal* 12, no. 2: 725-734.
- Gulati-Sakhuja, A, JL Sears, A Nunez, und HY Liu. 2009. Production of polyclonal antibodies against Pelargonium zonate spot virus coat protein expressed in Escherichia coli and application for immunodiagnosis. *Journal of virological methods* 160, no. 1-2: 29-37.
- Hartl, FU, J Martin, und W Neupert. 1992. Protein folding in the cell - the role of molecular chaperones HSP70 and HSP60. *Annual review of biophysics and biomolecular structure* 21: 293-322.
- Hartl, FU. 1996. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* 381: 571-580.
- Hartmann, J. 2008. Expression, Aufreinigung und pflanzenbiotechnologische Anwendung der FLP-Rekombinase aus *Saccharomyces cerevisiae*. Masterarbeit, Leibniz Universität Hannover.

- Hiatt, A, R Cafferkey, und K Bowdish. 1989. Production of antibodies in transgenic plants. *Nature* 342, no. 6245: 76-78.
- Hill, RW, und RG Raymond. 1962. Apparent natural infection of coturnix quail hens with the virus of avian encephalomyelitis: case report. *Avian diseases* 6, no. 2: 226-227.
- Hoekstra, J. 1964. Experiments with avian encephalomyelitis. *British veterinary journal* 120, no. 7: 322-&.
- Hohlstein, WM, DR Desmukh, CT Larsen, JH Sautter, BS Pomeroy, und JR McDowell. 1970. Epiornithic of avian encephalomyelitis in turkeys in minnesota. *American journal of veterinary research* 31, no. 12: 2233-2234.
- Holliger, P, T Prospero, und G Winter. 1993. Diabodies: small bivalent and bispecific antibody fragments. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90, no. 14: 6444-6448.
- Hood EE, SB Gelvin, LS Melchers, und A Hoekema. 1993. New agrobacterium helper plasmids for gene-transfer to plants. *Transgenic research* 2, no. 4, 208-218.
- Hoogenboom, HR, und G Winter. 1992. By-passing immunization. Human-antibodies from synthetic repertoires of germline VH gene segments rearranged invitro. *Journal of molecular biology* 227, no. 2: 381-388.
- Horn, ME, SL Woodard, und JA Howard. 2004. Plant molecular farming: systems and products. *Plant cell reports* 22, no. 10: 711-720.
- Horsch, RB, JE Fry, NL Hoffmann, D Eichholtz, SG Rogers, und RT Fraley. 1985. A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227, no. 4691: 1229-1231.
- Huber, A, S Demartis, und D Neri. 1999. The use of biosensor technology for the engineering of antibodies and enzymes. *Journal of molecular recognition* 12, no. 3: 198-216.
- Hust, M, und S Dübel. 2004. Mating antibody phage display with proteomics. *Trends in biotechnology* 22, no. 1: 8-14.
- Hust, M, M Meysing, T Schirrmann, M Selke, J Meens, GF Gerlach, und S Dübel. 2006. Enrichment of open reading frames presented on bacteriophage M13 using Hyperphage. *Biotechniques* 41, no. 3: 335-342.
- Hust, M. 2002. Rekombinante Antikörper gegen die NIa-Protease des Plum pox virus. Dissertation, Leibniz Universität Hannover.
- Hust, S, L Toleikis, und S Dübel. 2007. *Handbook of therapeutic antibodies*. Hg. v. S Dübel. 1. Aufl. Weinheim: Wiley-VCH.

- Huston, JS, D Levinson, M Mudgetthunter, MS Tai, J Novotny, MN Margolies, RJ Ridge, u. a. 1988. Protein engineering of antibody-binding sites - recovery of specific activity in an anti-digoxin single-chain Fv analog produced in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85, no. 16: 5879-5883.
- Ikeda, S, K Matsuda, und K Yonaiyama. 1976. Susceptibility of chickens to avian encephalomyelitis virus. 2. Behaviour of virus in day-old chicks. *National Institute of Animal Health quarterly* 16, no. 1: 1-7.
- Inbar, D, D Givol, und J Hochmann. 1972. Localization of antibody-combining sites within variable portions of heavy and light chains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 69, no. 9: 2659-&.
- Janeway, CA, P Travers , M Walport, und M Shlomchik. 2002. *Immunologie*. 5. Aufl. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- Johnsson, B, S Lofas, G Lindquist, A Edstrom, RMM Hillgren, und A Hansson. 1995. Comparison of methods for immobilization to carboxymethyl dextran sensor surfaces by analysis of the specific activity of monoclonal antibodies. *Journal of molecular recognition* 8, no. 1-2: 125-131.
- Johnsson, B, S Lofas, und G Lindquist. 1991. Immobilization of proteins to a carboxymethyl dextran modified gold surface for biospecific interaction analysis in surface-plasmon resonance sensors. *Analytical biochemistry* 198, no. 2: 268-277.
- Jones, EE. 1932. An encephalomyelitis in the chicken. *Science* 76, no. 1971: 331-332.
- Jones, EE. 1934. Epidemic tremor, an encephalomyelitis-affecting young chickens. *The Journal of experimental medicine* 59, no. 6: 781-798.
- Jungherr, E, und EL Minard. 1942. The present status of avian encephalomyelitis. *Journal of the American Veterinary Medical Association* 100: 38-46.
- Kabat, EA, und TT Wu. 1991. Identical V region amino acid sequences and segments of sequences in antibodies of different specificities. Relative contributions of VH and VL genes, minigenes, and complementarity-determining regions to binding of antibody-combining sites. *Journal of immunology* 147, no. 5: 1709-1719.
- Kaleta, EF, HE Brozeit, U Neumann, und W Plöger. 1974. Vergleichende Untersuchungen von Virusstämmen der aviären Enzephalomyelitis aus Huhn und Pute. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift* 82: 195-197.

- Kang, TJ, SC Han, und MS Yang. 2005. Expression of the B subunit of E-coli heat-labile enterotoxin in tobacco using a herbicide resistance gene as a selection marker. *Plant cell, tissue and organ culture* 81, no. 2: 165-174.
- Kay, R, A Chan, M Daly, und J McPherson. 1987. Duplication of CaMV-35S promoter sequences creates a strong enhancer for plant genes. *Science* 236, no. 4806: 1299-1302.
- Kipriyanov, SM, G Moldenhauer, und M Little. 1997. High level production of soluble single chain antibodies in small-scale Escherichia coli cultures. *Journal of immunological methods* 200, no. 1-2: 69-77.
- Klee, K. 2009. Mutagenese-strategien zur Affinitätsreifung Hapten spezifischer rekombinanter Antikörper. Dissertation, Leibniz Universität Hannover.
- Ko, K, R Brodzik, und Z Steplewski. 2009. Production of antibodies in plants: approaches and perspectives. *Plant-produces Microbial Vaccines* 332: 55-78.
- Korndörfer, IP, und A Skerra. 2002. Improved affinity of engineered streptavidin for the Strep-tag II peptide is due to a fixed open conformation of the lid-like loop at the binding site. *Protein science* 11: 883-893.
- Kortt, AA, LC Gruen, und GW Oddie. 1997. Influence of mass transfer and surface ligand heterogeneity on quantitative BIAcore(TM) binding data. Analysis of the interaction of NC10 fab with an anti-idiotypic Fab'. *Journal of molecular recognition* 10, no. 3: 148-158.
- Krauss, H, und S Uebers. 1966. Zur Ultrastruktur des Virus der Aviären Enzephalomyelitis. *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift* 79: 480-482.
- Kuroda, D, H Shirai, M Kobori, und H Nakamura. 2009. Systematic classification of CDR-L3 in antibodies: Implications of the light chain subtypes and the V-L-V-H interface. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 75, no. 1: 139-146.
- Lauer, B, I Ottleben, HJ Jacobsen, und T Reinard. 2005. Production of a single-chain variable fragment antibody against fumonisin B1. *Journal of agricultural and food chemistry* 53, no. 4: 899-904. doi:10.1021/jf048651s.
- Li, B, H Zhao, Q Liu, R Murali, M I Greene, und H Zhang. 2002. Deoxycholate-based method to screen phage display clones for uninterrupted open reading frames. *BioTechniques* 33, no. 2: 294-6.

- Loferer, H, M Hammar, und S Normark. 1997. Availability of the fibre subunit CsgA and the nucleator protein CsgB during assembly of fibronectin-binding curli is limited by the intracellular concentration of the novel lipoprotein CsgG. *Molecular microbiology* 26, no. 1: 11-23.
- Lundquist, R, LK Nielsen, A Jafarshad, D SoeSoe, LH Christensen, P Druilhe, und MH Dziegiel. 2006. Human recombinant antibodies against plasmodium falciparum merozoite surface protein 3 cloned from peripheral blood leukocytes of individuals with immunity to malaria demonstrate antiparasitic properties. *Infection and immunity* 74, no. 6: 3222-3231.
- Ma, JKC, PMW Drake, und P Christou. 2003. The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nature reviews. Genetics* 4, no. 10: 794-805.
- Malik, K, K Wu, XQ Li, T Martin-Heller, M Hu, E Foster, L Tian, u. a. 2002. A constitutive gene expression system derived from the tCUP cryptic promoter elements. *Theoretical and applied genetics* 105, no. 4: 505-514.
- Marks, JD, HR Hoogenboom, TP Bonnert, J McCafferty, AD Griffiths, und G Winter. 1991. By-passing immunization - human-antibodies from V-gene libraries displayed on phage. *Journal of molecular biology* 222, no. 3: 581-597.
- Marvil, P, NJ Knowles, AP Mockett, P Britton, TD Brown, und D Cavanagh. 1999. Avian encephalomyelitis virus is a picornavirus and is most closely related to hepatitis A virus. *The Journal of general virology* 80, no. 3: 653-662.
- Mathey, WJ. 1955. Avian encephalomyelitis in pheasants. *The Cornell veterinarian* 45, no. 1: 89-93.
- Matzk, A, S Mantell, und J Schiemann. 1996. Localization of persisting agrobacteria in transgenic tobacco plants. *Molecular plant-microbe interactions* 9, no. 5: 373-381.
- Miura, N, DR Shankaran, KV Gobi, T Kawaguchi, und SJ Kim. 2008. An overview of the development and application of surface plasmon resonance based immunosensors for detection of small molecules. *Sensor letters* 6, no. 6: 891-902.
- Mullis, K, F Faloona, S Scharf, R Saiki, G Horn, und H Erlich. 1986. Specific enzymatic amplification of DNA invitro - the polymerase chain-reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 51: 263-273.
- Nakata, Y, X Tang, und KK Yokoyama. 1997. Preparation of competent cells for high-efficiency plasmid transformation of Escherichia coli. *Methods in molecular biology* 69: 129-137.

- Odell, JT, F Nagy, und NH Chua. 1985. Identification of DNA-sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus-35S promoter. *Nature* 313, no. 6005: 810-812.
- Ottleben, I. 2006. Herstellung rekombinanter "single chain" Antikörper (scFv) gegen Sulfonamide. Disseration, Leibniz Universität Hannover.
- Padlan, EA. 1994. Anatomy of the antibody molecule. *Molecular immunology* 31, no. 3: 169-217.
- Pansri, P, N Jaruseranee, K Rangnoi, P Kristensen, und M Yamabhai. 2009. A compact phage display human scFv library for selection of antibodies to a wide variety of antigens. *BMC biotechnology* 9.
- Pelat, T, M Hust, E Laffly, F Condemine, C Bottex, D Vidal, MP Lefranc, S Dubel, und P Thullier. 2007. High-affinity, human antibody-like antibody fragment (single-chain variable fragment) neutralizing the lethal factor (LF) of *Bacillus anthracis* by inhibiting protective antigen-LF complex formation. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 51, no. 8: 2758-2764.
- Pini, A, F Viti, A Santucci, B Carnemolla, L Zardi, P Neri, und D Neri. 1998. Design and use of a phage display library - Human antibodies with subnanomolar affinity against a marker of angiogenesis eluted from a two-dimensional gel. *The Journal of biological chemistry* 273, no. 34: 21769-21776.
- Plückthun, A. 1991. Antibody engineering - advances from the use of *Escherichia coli* expression systems. *Bio/technology* 9, no. 6: 545-551.
- Plückthun, A, und A Skerra. 1989. Expression of functional antibody fv and fab fragments in *Escherichia coli*. *Methods in enzymology* 178: 497-515.
- Plückthun, A. 1990. Antibodies from *Escherichia coli*. *Nature* 347, no. 6292: 497-498.
- Plückthun, A, A Krebber, C Krebber, U Horn, U Knüpfer, R Wenderoth, L Nieba, K Proba, und D Riesenberg. 1996. Producing antibodies in *Escherichia coli*: from PCR to fermentation. In „*Antibody engineering: A practical approach*“, hg. v. J McCafferty. Oxford: Oxford University Press.
- Pugsley, AP. 1993. The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. *Microbiological pathways* 57, no. 1: 50-108.
- van Roekel, H , KL Bullis, und MK Clarke. 1938. Preliminary report on infectious avian encephalomyelitis. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, no. 93: 372-375.
- Rondot, S, J Koch, F Breitling, und S Dübel. 2001. A helper phage to improve single-chain antibody presentation in phage display. *Nature biotechnology* 19, no. 1: 75-78.

- Rosidi, B. 2002. Molekularbiologische und immunbiochemische Charakterisierung der Antigene des monoklonalen Antikörpers TIM-11B2. Universität Hannover.
- Sambrook, J, und DW Russell. 2001. *Molecular cloning – a laboratory manual*. 3. Aufl. Cold Spring Harbor - New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schaaf, K, und WF Lamoreux. 1955. Control of avian encephalomyelitis by vaccination. *American journal of veterinary research* 16, no. 61 Part 1: 627-33.
- Sche, PP, KM McKenzie, JD White, und DJ Austin. 2001. Display cloning: functional identification of natural product receptors using cDNA-phage display. *Chemistry & biology* 8, no. 4: 399-400.
- Schillberg, S, R Fischer, und N Emans. 2003. Molecular farming of recombinant antibodies in plants. *Cellular and molecular life sciences* 60, no. 3: 433-445.
- Schirrmann, T, L Al-Halabi, S Dübel, und M Hust. 2008. Production systems for recombinant antibodies. *Frontiers in Bioscience* 13: 4576-4594.
- Schneider, M. 2005. Selektion endothelzellspezifischer Antikörper mittels Phage Display. Freie Universität Berlin.
- Shafren, DR, und GA Tannock. 1992. Further evidence that the nucleic acid of avian encephalomyelitis virus consists of RNA. *Avian diseases* 36, no. 4: 1031-3.
- Silacci, M, S Brack, G Schirru, J Mårlind, A Ettorre, A Merlo, F Viti, und D Neri. 2005. Design, construction, and characterization of a large synthetic human antibody phage display library. *Proteomics* 5, no. 9: 2340-2350.
- Skerra, A. 1994. Use of the tetracycline promoter for the tightly regulated production of a murine antibody fragment in Escherichia-coli. *Gene* 151, no. 1-2: 131-135.
- Sletta, H, A Tondervik, S Hakvag, TEV Aune, A Nedal, R Aune, G Evensen, S Valla, TE Ellingsen, und T Brautaset. 2007. The presence of N-terminal secretion signal sequences leads to strong stimulation of the total expression levels of three tested medically important proteins during high-cell-density cultivations of Escherichia coli. *Applied and environmental microbiology* 73, no. 3: 906-912.
- Smith, GP. 1985. Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface. *Science* 228, no. 4705: 1315-1317.
- Smith, GR, R Ford, JD Bryant, RL Gambley, TK McGhie, RM Harding, und JL Dale. 1995. Expression, purification and use as an antigen of recombinant sugarcane mosaic-virus coat protein. *Archives of virology* 140, no. 10: 1817-1831.

- Sparkes, IA, J Runions, A Kearns, und C Hawes. 2006. Rapid, transient expression of fluorescent fusion proteins in tobacco plants and generation of stably transformed plants. *Nature protocols* 1, no. 4: 2019-2025.
- Sparrow, PAC, JA Irwin, PJ Dale, RM Twyman, und JKC Ma. 2007. Pharma-Planta: Road testing the developing regulatory guidelines for plant-made pharmaceuticals. *Transgenic research* 16, no. 2: 147-161.
- Stenberg, E, B Persson, H Roos, und C Urbaniczky. 1991. Quantitative determination of surface concentration with surface plasmon resonance using radio-labelled proteins. *Journal of colloid and interface science* 143, no. 2: 513-526.
- Stoger, E, M Sack, L Nicholson, R Fischer, und P Christou. 2005. Recent progress in plantibody technology. *Current pharmaceutical design* 11, no. 19: 2439-2457.
- Tang, XR, Y Nakata, HO Li, MD Zhang, H Gao, A Fujita, O Sakatsume, T Ohta, und K Yokoyama. 1994. The optimization of preparations of competent cells for transformation of escherichia-coli. *Nucleic acids research* 22, no. 14: 2857-2858.
- Tannock, GA, und DR Shafren. 1985. A rapid procedure for the purification of avian encephalomyelitis viruses. *Avian diseases* 29, no. 2: 312-321.
- Tannock, GA, und DR Shafren. 1994. Avian encephalomyelitis: A review. *Avian pathology: journal of the W.V.P.A* 23, no. 4: 603-20.
- Taylor, JRE, und EP Schelling. 1960. The distribution of avian encephalomyelitis in North America as indicated by an immunity test. *Avian diseases* 4: 122-133.
- Taylor, LW, DC Lowry, und LG Raggi. 1955. Effects of an outbreak of avian encephalomyelitis (epidemic tremor) in a breeding flock. *Poultry science* 34: 1036-1045.
- Thole, V, B Worland, JW Snape, und P Vain. 2007. The pCLEAN dual binary vector system for Agrobacterium-Mediated plant transformation. *Plant physiology* 145, no. 4: 1211-1219.
- Torreri, P, M Ceccarini, P Macioce, und TC Petrucci. 2005. Biomolecular interactions by surface plasmon resonance technology. *Annali dell'Istituto superiore di sanità* 41, no. 4: 437-441.
- Tur, MK, M Huhn, S Sasse, A Engert, und S Barth. 2001. Selection of scFv phages on intact cells under low pH conditions leads to a significant loss of insert-free phages. *BioTechniques* 30, no. 2: 404-+.
- Vain, P, KR Finer, DE Engler, RC Pratt, und JJ Finer. 1996. Intron-mediated enhancement of gene expression in maize (*Zea mays* L) and bluegrass (*Poa pratensis* L). *Plant cell*

- reports* 15, no. 7: 489-494.
- Vaucheret, H, C Beclin, und M Fagard. 2001. Post-transcriptional gene silencing in plants. *Journal of cell science* 114, no. 17: 3083-3091.
- Viti, F, F Nilsson, S Demartis, A Huber, und D Neri. 2000. Design and use of phage display libraries for the selection of antibodies and enzymes. *Methods in enzymology* 326: 480-505.
- Wandelt, CI, MRI Khan, S Craig, HE Schröder, D Spencer, und TJV Higgins. 1992. Vicilin with carboxy-terminal KDEL is retained in the endoplasmic-reticulum and accumulates in the leaves of transgenic plants. *The Plant journal : for cell and molecular biology* 2, no. 2: 181-192.
- Ward, ES, D Güssow, AD Griffiths, PT Jones, und G Winter. 1989. Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from *Escherichia coli*. *Nature* 341, no. 6242: 544-546.
- Wei, L, LL Chee, T Wei, J Kwang, J Zhou, J Wang, L Shi, und J Liu. 2008. The VP1 protein of avian encephalomyelitis virus is a major host-protective immunogen that serves as diagnostic potential. *Journal of virological methods* 149, no. 1: 56-62.
- Westbury, HA, und B Sinkovic. 1978. The pathogenesis of infectious avian encephalomyelitis. The effect of the age of the chicken and the route of administration of the virus. *Australian veterinary journal* 54: 68-71.
- Willats, WGT. 2002. Phage display: practicalities and prospects. *Plant molecular biology* 50, no. 6: 837-854.
- Winter, G, AD Griffiths, RE Hawkins, und HR Hoogenboom. 1994. Making antibodies by phage display technology. *Annual review of immunology* 12: 433-455.
- Winter, G, und C Milstein. 1991. Man-made antibodies. *Nature* 349, no. 6307: 293-299.
- Wörn, A, und A Plückthun. 2001. Stability engineering of antibody single-chain Fv fragments. *Journal of molecular biology* 305, no. 5: 989-1010.

7 Anhang

Proteinsequenzen

VP2

NGENTESYAGPDRTAVVGGGFLTTVDQSSVSTATMGSLQDVQYRTAVDIPGSRVIQG
ERFFLIDQREWNSTQSEWQLLGKIDIVKELLDQSYAVDGLLKYHSYARFGLDVIVQIN
PTSFAQAGGLIAALVPYDQVDIESIAAMTTYCHGKLNCNINNVRMKVPYIYSRGCYNL
RNSAYPIWMLVIRVWSQLQLGSGTSTQITVTTLARFVDLELHGLSPLVAQ

scFv VP2 20

MAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGS
GGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKKWRLPFDYWGQ
GTLVTVSRGGGGSGGGGSGGGGSSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASW
YQQKPGQAPVLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSSPH
HKTPVVFGGGTKLTVLG

scFv AEV 5

MAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSAISGS
GGSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRRTTKFDYWGQG
TLVTVSRGGGGSGGGGSGGGGSSELTQDPAVSVALGQTVRITCQGDSLRSYYASWY
QQKPGQAPVLVIYGKNNRPSGIPDRFSGSSSGNTASLTITGAQAEDEADYYCNSSTGQI
RPVVFGGGTKLTVLG

Danksagung

Zuallererst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. H.-J. Jacobsen für die Möglichkeit zur Durchführung der Arbeit, die guten Arbeitsmöglichkeiten und die freundliche Arbeitsatmosphäre bedanken.

Herrn Prof. Dr. E. Maiß danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Mein besonderer Dank gilt Dr. T. Reinard für die Betreuung meiner Arbeit, seine stetige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft und seinen unerschütterlichen Optimismus.

Der Firma Lohmann Animal Health möchte ich für die Bereitstellung von AE Virus-Material und die stets gute Zusammenarbeit danken.

Ich danke allen Mitgliedern der Abteilung Pflanzenbiotechnologie des Instituts für Pflanzengenetik für die Hilfsbereitschaft und die immer freundliche Laboratmosphäre. Hier gilt mein besonderer Dank den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Molekulare Biochemie.

Ein großer Dank geht auch an Sandra Schmakeit für die Versorgung meiner Pflanzen und an Martina Famulla, die mich ebenfalls tatkräftig unterstützt hat.

Katharina Klee möchte ich besonders für die immer nette Zusammenarbeit, ständige Hilfsbereitschaft und die gemeinsam verbrachte Zeit danken. Noel Ferro danke ich für seine stetigen Bemühungen insbesondere im Bereich der Oberflächenplasmonresonanz. Bei André Frenzel möchte ich mich für sein stets offenes Ohr und seine Geduld.

Ein ganz besonderer Dank geht an Guido Kariger dafür, dass er mir in allen erdenklichen Situationen den Rücken stärkt.

Mein größter Dank gilt meiner Familie, die immer bedingungslos hinter mir gestanden haben und die mir die Möglichkeit für diesen Lebensweg eröffnet haben.